

Riassunto	I
Summary	III
 1. INTRODUZIONE	
1.1 I ROS nelle funzioni cellulari	1
1.1.1 I ROS come secondi messaggeri	2
1.1.2 I ROS e l'invecchiamento	5
1.1.3 I ROS e l'apoptosi	6
1.2 I sistemi cellulari di difesa antiossidante	7
1.3 Resistenza allo stress ossidativo	9
1.4 Nrf2 e la risposta allo stress ossidativo	12
1.5 p53 nelle funzioni cellulari	15
1.6 p53 come repressore trascrizionale	19
1.7 Il dietilmaleato (DEM) genera condizioni proossidanti nella cellula	23
1.8 Scopo della ricerca	25
 2. MATERIALI E METODI	
2.1 Colture cellulari	26
2.2 Estrazione dell'RNA e reazione della trascrittasi inversa	26
2.3 PCR Real-Time quantitativa	27
2.4 Plasmidi e trasfezioni	29
2.5 Preparazione di estratti proteici nucleari e totali per Western Blot	30
 3. RISULTATI	
3.1 Alcuni geni correlati alle difese antiossidanti sono iperespressi in cellule resistenti allo stress ossidativo indotto dal DEM	32
3.2 Regolazione trascrizionale di GST a1 e x-CT nei cloni resistenti al DEM	33
3.3 L'iperespressione di p53 interferisce con l'induzione mediata da Nrf2 dei promotori contenenti sequenze ARE	35
3.4 Il danno al DNA attiva p53 che contrasta l'attivazione di geni Nrf2-dipendenti	37
3.5 Il danno al DNA si contrappone alla risposta antiossidante mediata da Nrf2 attraverso un meccanismo p53-dipendente	38
 4. DISCUSSIONE E PROSPETTIVE FUTURE	41
 5. BIBLIOGRAFIA	45

1. INTRODUZIONE

1.1 I ROS nelle funzioni cellulari

Nei sistemi biologici, i radicali liberi dell'ossigeno o ROS (Reactive Oxygen Species) vengono generati ed eliminati continuamente. Essi vengono prodotti sia attraverso una serie di reazioni catalizzate da enzimi che attraverso reazioni di natura non enzimatica. I ROS inoltre, possono essere prodotti anche in conseguenza di esposizione a radiazioni ionizzanti, xenobiotici, agenti chemoterapici (1).

I ROS vengono definiti comunemente come composti con elevata reattività chimica. I principali ROS sono: $O_2^{\bullet-}$ (anione superossido), $^{\bullet}O_2H$ (radicale idroperossido); $^{\bullet}OH$ (radicale idrossilico); NO^{\bullet} (monossido d'azoto); $ONOO^-$ (anione perossinitrito). Esistono altre molecole, quali H_2O_2 (perossido d'idrogeno) e $HOCl$ (acido ipocloroso) che pur non essendo radicali di per sé, producono facilmente il radicale idrossilico, altamente reattivo (2, 3).

I mitocondri vengono considerati la fonte principale di ROS cellulari poiché i radicali del superossido vengono generati costantemente durante la fosforilazione ossidativa e possono essere convertiti in H_2O_2 ed altre specie reattive dell'ossigeno (4). Nella cellula, i ROS oltre che nei mitocondri, vengono generati anche in altri compartimenti e da molti enzimi.

Un contributo importante deriva dal complesso multienzimatico della membrana plasmatica dell' $NAD(P)H$ ossidasi (5). È interessante notare che è stato recentemente dimostrato che la produzione di ROS da parte di tale complesso svolge un ruolo nella regolazione della trasduzione del segnale intracellulare (6).

Nel reticolo endoplasmatico liscio, il complesso del citocromo P-450, un'eme-proteina che catalizza reazioni di idrossilazione di substrati organici o xenobiotici può generare l'anione superossido mediante riduzione diretta dell'ossigeno (7).

Nei perossisomi, la β -ossidazione degli acidi grassi e la deaminazione ossidativa di alcuni amminoacidi genera H_2O_2 (8).

L' H_2O_2 può essere prodotta anche da alcune ossidasi citosoliche quali cicloossigenasi, monoamina-ossidasi, xantina deidrogenasi, lipoossigenasi (3).

A concentrazioni elevate i ROS sono dannosi per l'organismo in quanto essi attaccano i maggiori costituenti della cellula, partecipando così a processi complessi quali l'invecchiamento (9) e le patologie ad esso correlate (10, 11), nonché all'induzione e al mantenimento dello stato trasformato (11 e referenze contenute in essa).

A concentrazioni moderate, tuttavia, i ROS partecipano attivamente ad una varietà di processi biologici complessi, implicati nella normale crescita cellulare quali la trasduzione del segnale, il controllo dell'espressione genica, la senescenza cellulare, l'apoptosi (12, 13, 14 e Figura 1A).

I radicali più rilevanti nelle funzioni biologiche sono il superossido e l'NO. Essi sono formati da due gruppi di enzimi: le isoforme della NAD(P)H ossidasi (6), e le isoforme della ossido nitrico sintasi (NOS), rispettivamente (15).

1.1.1. I ROS come secondi messaggeri

Sul ruolo dei ROS come molecole segnale (secondi messaggeri), durante gli ultimi anni, sono emerse numerose evidenze sperimentali (12, 13, 14). In particolare, i primi studi iniziati nel 1995 da Finkel e collaboratori dimostrarono che durante la trasduzione del segnale mitogenico mediata dal recettore del PDGF (Platelet Derived Growth Factor Receptor), si genera H_2O_2 (16). Successivamente fu visto che la stimolazione di differenti classi di recettori tirosino-chinasi comporta produzione di ROS intracellulari. I relativi studi furono effettuati con EGF-R (Epidermal Growth Factor Receptor), Src e proteine della stessa famiglia (Lyn, Fyn, Lck, ZAP 70); recettori per citochine; recettori serina/treonina-chinasi, come quelle della famiglia delle MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) ovvero ERK 1 e 2 (Extracellular signal-regulated protein kinase, p42 e p44), p38 MAPK, JNK (c-Jun N-terminal Kinase) e BMK1 (Big Map Kinase 1); recettori collegati alle proteine G (12, 13, 14).

Va notato che durante la trasduzione del segnale, i recettori di membrana di vari fattori di crescita, citochine o altri ligandi inducono effetti a feedback positivo, attivando contemporaneamente la NAD(P)H ossidasi via induzione di Rac1, una subunità del complesso attivo dell'NAD(P)H ossidasi (6).

I bersagli cellulari a valle dei ROS sono stati a lungo studiati, e nonostante i notevoli progressi degli ultimi anni, essi non sono stati ancora completamente

definiti. Una ben nota classe di proteine che viene attivata dai ROS è rappresentata dalle chinasi, enzimi che fosforilano le proteine bersaglio in residui di serina, treonina o di tirosina (12). La via di trasduzione del segnale meglio caratterizzata dei recettori tirosina-chinasi è quella Ras/Raf/MEK/ERK, che controlla risposte cellulari fondamentali quali proliferazione, differenziamento, apoptosi. Tale via coinvolge una “cascata” di proteine chinasi ed è (Raf/MEK/ERK) controllata a monte da *ras*, una proteina G legata alla membrana plasmatica che funge da molecola adattatrice. La proteina *ras* attivata induce la traslocazione di Raf, un membro della famiglia Ser/Thr chinasi, in prossimità della membrana plasmatica. Raf attivato induce la fosforilazione di MEK, che risulta così capace di fosforilare ed attivare ERK, una classe di proteine chinasi che ha numerosi substrati tra cui fattori di trascrizione, proteine del citoscheletro, chinasi, fosfatasi e altri enzimi ancora (17).

Il livello di proteine fosforilate nella cellula è strettamente controllato dagli effetti contrapposti di un'altra classe di enzimi: le fosfatasi, che provvedono a rimuovere i fosfati dalle proteine. Di queste se ne conoscono 2 classi più importanti, che differiscono per la specificità del substrato. Un effetto indotto dai ROS è l'inibizione delle proteine tirosina-fosfatasi (18). Le basi molecolari di tale evento sono note e implicano modificazioni dipendenti dallo stress ossidativo di alcuni residui di cisteine che fanno parte del sito catalitico di tali enzimi (18, 19).

Accanto all'attivazione dei membri delle cascate del segnale, i ROS possono regolare direttamente l'attività dei fattori di trascrizione, che dipende, almeno in parte, dallo stato redox di alcune cisteine (20). Infatti, la maggior parte dei fattori di trascrizione redox-sensibili possiede delle cisteine conservate, la cui mutazione non permette di “sentire” i cambiamenti dello stato redox della cellula, oppure dei livelli di una particolare molecola effettore correlata allo stato redox (21).

Nel laboratorio dove ho svolto la tesi di dottorato è stato dimostrato che l'efficienza di legame al DNA di alcuni fattori trascrizionali è redox-dipendente, come il caso di Sp1, il recettore per i glucocorticoidi e il fattore Erg (20). Questi fattori, in seguito a modificazioni dell'ambiente redox intracellulare, mostrano una attività di legame al DNA ridotta. Il fattore Sp1, ad esempio, possiede, nel motivo “zinc finger” del dominio di legame al DNA, una

cisteina suscettibile a variazioni redox intracellulari. In particolare l'attività di Sp1 risulta fortemente ridotta sia *in vitro* che *in vivo* in seguito a trattamento con agenti ossidanti.

Un altro fattore la cui attività dipende dallo stato redox cellulare è AP-1 (activator protein-1), un eterodimero di c-Fos e c-Jun. AP-1 contiene una cisteina nel dominio di legame al DNA, la cui ossidazione blocca l'attività trascrizionale di tale fattore (22).

Un altro fattore trascrizionale controllato da modificazioni redox-dipendenti è Nrf2 (NF-E2 related factor). Tale fattore, come verrà descritto in un prossimo paragrafo, è essenziale per la regolazione di geni responsivi a diversi tipi di stress, incluso quello ossidativo (23). Esso pur non avendo una cisteina nel suo dominio di legame al DNA, è regolato dall'ambiente redox cellulare. Infatti, in condizioni basali Nrf2 è sequestrato nel citoplasma da Keap1, una proteina legata al citoscheletro di actina (24). Lo stress ossidativo distrugge il complesso Nrf2/Keap1, Nrf2 migra nel nucleo dove in combinazione eterodimerica con altri fattori induce la trascrizione di geni correlati alla risposta allo stress ossidativo (25 e Figura 2). Keap1 possiede venticinque residui di cisteina e recenti osservazioni hanno dimostrato che alcuni residui di cisteina svolgono funzione di “sensori” per il sistema di regolazione Nrf2/Keap1 (26).

Anche il fattore trascrizionale p53 possiede alcuni residui di cisteina ridotti che sono cruciali per il suo legame al DNA (27) e mutazioni di questi residui di cisteina sono stati trovati in molti cancro umani (28).

Un'altra modalità della regolazione redox dell'attività dei fattori di trascrizione è fornita da sistemi di degradazione proteica redox-sensibili. Un esempio è fornito dal fattore HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1) che controlla l'espressione del gene dell'eritropoietina. HIF-1 attivo è un eterodimero formato da due subunità: HIF1 α e HIF1 β , codificate da geni diversi ed espresse costitutivamente. I cambiamenti nella tensione di ossigeno si riflettono solo su HIF1 α , che in condizioni normali è degradato rapidamente dal proteasoma in maniera dipendente dallo stato redox intracellulare (29). In condizioni di ipossia il pathway dell'ubiquitina viene inibito e ciò comporta aumento dei livelli di HIF-1 α con possibilità di formare così l'eterodimero attivo (30).

1.1.2 I ROS e l'invecchiamento

Diversi risultati sperimentali hanno dimostrato che i ROS e il danno ossidativo indotto dai ROS sono alla base dell'invecchiamento e di malattie correlate all'invecchiamento (9). Tale meccanismo non è stato ancora compreso e sin dalla pubblicazione della teoria di Harman sull'invecchiamento (31), numerose evidenze sperimentali hanno indicato che lo stress ossidativo è implicato nel processo dell'invecchiamento. Tale ipotesi, rafforzata, ma non confermata, sostiene che l'invecchiamento dei mammiferi è associata all'accumulo di danni ossidativi nel DNA, nelle proteine e nei lipidi (32, 33). Dati recenti ottenuti in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, e topi, infatti, confermano che esiste una correlazione tra aumentata resistenza allo stress ossidativo e longevità (34).

Un modello utilizzato *in vitro* per studiare l'invecchiamento è quello della senescenza cellulare, che venne identificato come un processo che limita la capacità di cellule normali di proliferare in coltura. Tale arresto irreversibile della crescita è causato fondamentalmente da due meccanismi intercomunicanti: l'accorciamento dei telomeri dei cromosomi e i danni cumulativi alla cellula di varia natura tra cui quelli ossidativi (35). I telomeri si trovano alle estremità dei cromosomi e servono a stabilizzare il DNA. Quando si genera una erosione a tali estremità, la cellula attiva un programma di senescenza. Questa risposta, almeno in alcune cellule, richiede l'attività di una via di traduzione che coinvolge la proteina p53, "il guardiano" del genoma (36). È interessante notare che alcuni oncogeni attivati, tra cui il *K-rasV12*, capaci di indurre un segnale cellulare non regolato, inducono *in vivo* la senescenza cellulare (37) e che tale processo è mediato da un aumento di ROS intracellulari (35).

Molti dati sperimentali provenienti da vari laboratori, incluso il nostro (38) hanno dimostrato che l'esposizione di cellule primarie in coltura a stress di varia natura tra cui uno stress ossidativo moderato prolungato, induce un arresto irreversibile della crescita. Tale fenomeno viene interpretato come un importante meccanismo di protezione contro l'insorgenza del cancro (39).

Per eliminare le cellule danneggiate e prevenire così l'insorgenza del cancro oltre alla senescenza cellulare gli organismi multicellulari attivano un altro processo fisiologico: l'apoptosi, un programma di morte cellulare che svolge un ruolo durante lo sviluppo. Le cellule possono rispondere ad insulti ossidativi

attivando un programma di apoptosi (39, 40). I mitocondri giocano un ruolo centrale nell'apoptosi (4, 41). Essi contengono un numero di fattori pro-apoptotici quali citocromo c, aif, (apoptosis-inducing factor), Smac/DIABLO ed endo G, che vengono rilasciati nel citosol in seguito a permeabilizzazione della membrana mitocondriale, indotta da uno stimolo di natura apoptotica. La realizzazione dell'apoptosi comporta l'attivazione di alcune proteine effettrici denominate caspasi. Sono state caratterizzate due vie di trasduzione del segnale apoptotico generali indipendenti che portano entrambe ad attivazione delle caspasi. Queste sono enzimi proteolitici secreti come zimogeni inattivi e vengono processati proteoliticamente ad uno stato attivo in seguito ad uno stimolo apoptotico (42). Questi enzimi svolgono una serie di attività che rappresentano la fase esecutiva del processo apoptotico: inattivano proteine ed enzimi coinvolti nella crescita cellulare, nel riparo, nella replicazione del DNA ma anche enzimi con funzione anti-apoptotica, quale ad esempio il ben noto Bcl2 (42, 43). Tale attività provoca condensazione della cromatina, frammentazione del DNA e distruzione delle membrane cellulari.

1.1.3 I ROS e l'apoptosi

I ROS sono dei regolatori dell'apoptosi, in quanto essi inducono l'apertura dei pori sulla membrana mitocondriale con rilascio di fattori pro-apoptotici (43) e inoltre inducono l'attivazione di varie cascate di segnali tra cui stimolazione della produzione di ceramidi, attivazione di JNK (44), attivazione di p53 (45, 46) il cui ruolo in tale processo sarà meglio discusso più avanti.

Anche l'apoptosi indotta da TNF- α inizia con una produzione di ROS: questo tipo di risposta avviene principalmente nei linfociti T, nei monociti e macrofagi in seguito al legame con specifici recettori di membrana (47).

La relazione tra ossidanti e apoptosi è complessa e non ancora ben definita. Infatti mentre la maggior parte dei dati indica che i ROS stimolano morte cellulare, altri dati suggeriscono che i ROS sono protettivi nei riguardi dell'apoptosi (48).

I meccanismi che permettono alla cellula una decisione tra morte e vita sono finemente regolati e in molti casi lo stesso stimolo che induce apoptosi inizia anche un programma antiapoptotico (49). Probabilmente i ROS possono controllare sia l'apoptosi che la sopravvivenza cellulare attraverso una rete di

comunicazione tra meccanismi apoptotici e sistemi di trasduzione del segnale che attivano la sopravvivenza cellulare, quali la proteina Serina/Tirosina chinasi PI3K/AKT (50). Questo effetto di sopravvivenza indotto dai ROS sembra essere mediato da alcune proteine sensibili allo stato redox, tra cui NFκ-B (51).

Come già discusso, un'esposizione di ROS intracellulari può indirizzare verso l'apoptosi o la senescenza cellulare. Tuttavia alcune cellule possono sfuggire a tali controlli e la loro continua esposizione ai ROS può indurre mutazioni a carico del DNA con instabilità genomica che è alla base della trasformazione neoplastica (52 e Figura 1B).

E' di interesse notare che le cellule trasformate producono elevati livelli di ROS, in particolare di H_2O_2 (53). Tale esposizione ai ROS nelle cellule maligne può indurre svariate risposte che vanno da incremento della proliferazione cellulare, accumulo di danni ossidativi al DNA con mutazioni, ad aumento dell'espressione di geni antiossidanti e si può speculare che ciò comporta anche alterazioni nella resistenza di tali cellule ad agenti antitumorali (49).

Una spiegazione di come i ROS partecipano a processi così diversi è che il loro effetto dipende dalla quantità e dalla durata del "burst" ossidativo, anche se non è noto come la cellula opera un controllo sulla qualità e sulla quantità dei ROS. Certamente la produzione ed il livello dei ROS nella cellula è sotto stretto controllo in quanto, come già detto, una loro eccessiva produzione comporta effetti citotossici, ma ROS specifici a basse concentrazioni possono comportarsi come secondi messaggeri.

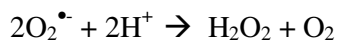
1.2 I sistemi cellulari di difesa antiossidante

La cellula ha sviluppato un sofisticato sistema di difesa nei confronti dei ROS di natura enzimatica e non (attività "spazzina" o "scavenger"). Tali meccanismi di difesa sono fondamentali per l'omeostasi redox cellulare che dipende dal bilancio tra generazione dei ROS e sistemi antiossidanti. Quando l'equilibrio si sposta a favore dei primi oppure la cellula si trova in uno stato di carenza di difese antiossidanti si crea la condizione di stress ossidativo,

I principali enzimi responsabili dell'omeostasi redox cellulare sono la superossido dismutasi (SOD) (54), la catalasi (55), la glutatione perossidasi (56), la tioredossina (57, 58) e la perossiredossina (59) che funzionano come

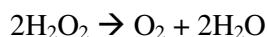
“scavengers” dei ROS, ma non possono intervenire direttamente sulle macromolecole biologiche a rimuovere un danno già avvenuto.

La SOD catalizza la reazione di dismutazione dell'anione superossido:

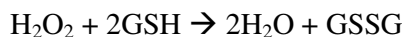


E' un enzima che può trovarsi nel citosol o nel nucleo e in tal caso richiede come cofattori il rame o lo zinco, oppure nei mitocondri dove utilizza come cofattore il manganese.

La catalasi catalizza la reazione:



La glutathione perossidasi, un enzima che contiene un atomo di selenio, riduce l' H_2O_2 attraverso l'ossidazione del glutathione ridotto (GSH):



Il glutathione è un tripeptide derivato da glicina, glutammato e cisteina ed è una molecola molto abbondante nella cellula, talvolta presente anche a concentrazioni millimolari. Esso contiene un gruppo tiolico fornito dalla cisteina, che serve come centro reattivo nelle difese antiossidanti, nel metabolismo degli xenobiotici e degli eicosanoidi, nonché nella regolazione del ciclo cellulare e dell'espressione genica (60).

Una piccola proteina ubiquitaria con attività antiossidante che contiene due cisteine è la tioredossina (57, 58), che trasporta atomi di idrogeno, forniti dal NADPH. Questa proteina è parte di un sistema multiproteico che vede il coinvolgimento di altri due enzimi quali la tioredossina reduttasi e la tioredossina perossidasi. Recentemente sono stati isolati alcuni membri di una famiglia di “scavenger” di perossidi, chiamata comunemente perossiredossina, che per ridurre utilizzano gli elettroni forniti dalla tioredossina.

Le principali molecole non enzimatiche che contribuiscono all'equilibrio redox cellulare sono la vitamina C (o acido ascorbico), la vitamina E (o α -tocoferolo), vitamina A (o β -carotene), l'urato, il piruvato, e infine il GSH (3).

La vitamina C e la vitamina E agiscono in maniera coordinata e sinergica: la vitamina C, idrosolubile, rigenera l' α -tocoferolo trasformandosi in radicale ascorbico, e viene riconvertita ad acido ascorbico da una reduttasi NADPH-dipendente. L' α -tocoferolo, una vitamina liposolubile, protegge le membrane

dal danno ossidativo in quanto blocca le reazioni a catena caratteristiche del processo di perossidazione lipidica delle membrane biologiche.

1.3 Resistenza allo stress ossidativo

I fenotipi molecolari che caratterizzano la resistenza cellulare allo stress ossidativo sono associati ad espressione elevata di enzimi antiossidanti e di sistemi di riparo del DNA, così come ad attivazione di geni che inducono arresto del ciclo cellulare e riducono l'apoptosi. Detta resistenza si realizza mediante attivazione o repressione di numerosi geni bersaglio con modificazione del loro profilo di espressione. Numerosi studi indicano un ruolo importante di alcune proteine cardine (FOXO, p66shc, SIRT, Nrf2, p53), che mediano, con meccanismi ancora sconosciuti, la comparsa di un fenotipo cellulare resistente allo stress ossidativo. Come già discusso, l'interesse di tale argomento è notevole perché la resistenza allo stress ossidativo è correlata all'invecchiamento, al cancro e alla resistenza alla chemioterapia.

Nell'ultimo decennio importanti scoperte hanno contribuito alla comprensione della regolazione della durata della vita negli organismi inferiori (61). I risultati accumulati indicano una forte correlazione tra resistenza cellulare allo stress ossidativo ed allungamento della durata della vita (4, 9). Nel verme *C. elegans* il fattore di trascrizione DAF-16, correlato a FOXO, è il determinante genetico della longevità. Questo fattore media la risposta della trasduzione del segnale insulina/IGF-1 dipendente che controlla diverse funzioni cellulari tra le quali la resistenza allo stress (62). La via del segnale dell'insulina/IGF-1-like regola negativamente l'attività del fattore DAF-16/FOXO. In accordo con ciò, inattivazione di questa via con conseguente attivazione di DAF-16, allunga la durata della vita dell'organismo. A livello molecolare, FOXO svolge un programma che coinvolge la regolazione coordinata di numerosi geni. Alcuni di questi geni sono coinvolti nell'arresto del ciclo cellulare (p27^{Kip1}), altri nel riparo del DNA (GADD45) e altri ancora nella detossificazione dei ROS (MnSOD e Catalasi) (63).

Sull'invecchiamento nei mammiferi si sa molto meno, ma tra i vari parallelismi che sono emersi, due risultati sono di particolare nota e sono in linea con

l'ipotesi che l'aumentata resistenza allo stress ossidativo è alla base della longevità (64).

Primo, i topi p66shc ^{-/-} che hanno una durata di vita 30% più lunga della loro controparte normale, sono più resistenti allo stress ossidativo (65). Infatti, è stato dimostrato che le cellule p66shc ^{-/-} hanno un aumento sia nello “scavenging” dell'acqua ossigenata che nella resistenza allo stress ossidativo e all'apoptosi indotta da diversi segnali, tra cui H₂O₂ e UV, e ciò è dovuto ad attività più elevata delle proteine FOXO (66). Recentemente è stato riportato, in accordo con il suo ruolo sulla durata della vita, che p66shc è un enzima redox che genera H₂O₂ a livello dei mitocondri che serve come segnale per l'apoptosi (67).

Secondo, è stato recentemente riportato che topi knockout per sirtuina (SIRT6), una istone deacetilasi NAD-dipendente di mammifero (68), mostrano un fenotipo simile all'invecchiamento precoce (69). SIRT6 infatti, è un enzima associato alla cromatina ed è coinvolto nel principale meccanismo di riparo del DNA: l'escissione di basi (BER), che ripara lesioni del DNA a singolo filamento che avvengono spontaneamente nel corso della vita dell'organismo. Un altro membro della famiglia delle sirtuine, SIRT1, interagisce e regola non solo gli istoni, ma anche numerosi fattori di trascrizione tra cui FOXO e p53. In *C. elegans* l'allungamento della vita DAF-16/FOXO-dipendente, è correlata specificamente all'attività di SIRT1 che ha un doppio effetto sulla funzione di FOXO: induce arresto del ciclo cellulare e resistenza allo stress ossidativo ma inibisce la morte cellulare dipendente da FOXO (70).

E' di interesse che la restrizione calorica (nota per avere un ruolo fondamentale nell'allungamento della durata della vita) attiva la deacetilasi SIRT1 (71), provocando così l'attivazione di FOXO.

Il soppressore di tumore p53 è un altro substrato delle deacetilasi SIRT1 (72, 73). L'attività di p53 è aumentata dall'acetilazione della lisina 382 e SIRT1 modula i livelli di acetilazione di questa lisina. Da notare che la deacetilazione di p53 aumenta la sopravvivenza cellulare in condizioni di stress (73).

p53 è un regolatore centrale della risposta cellulare allo stress, agli insulti genotossici e al danno al DNA. p53 è capace di provocare arresto del ciclo cellulare con induzione di geni di risposta al danno e se il danno è notevole p53

è capace di provocare apoptosi (74). Tuttavia, i meccanismi coinvolti nella decisione tra queste risposte cellulari non sono stati ancora definiti.

E' stato dimostrato che p53 possiede sia effetti pro-ossidanti (75) che anti-ossidanti (76). Questi due effetti opposti sono dovuti all'induzione dell'espressione da parte di p53 di geni pro- ed anti-ossidanti, rispettivamente. I diversi ruoli di p53 sono correlati alla severità dello stress. Infatti, le funzioni antiossidanti di p53 sono associate ad induzione di geni bersaglio che abbassano i livelli dei ROS durante uno stress fisiologico, non letale. Al contrario, gli effetti pro-ossidanti sono la conseguenza dell'induzione di geni pro-apoptotici che generano i ROS. Entrambi gli effetti sono componenti importanti dell'attività di soppressore di tumori di p53, che rappresenta una barriera contro le alterazioni genetiche coinvolte nella formazione dei tumori. Infatti, è stato dimostrato che la perdita della funzione di p53 *in vivo* aumenta i ROS intracellulari ed accelera la crescita dei tumori (76).

Quindi, può essere speculato che cellule resistenti allo stress ossidativo risultano più esposte al rischio di trasformazione neoplastica rispetto alle cellule normali. Attualmente non è noto quale dei due effetti opposti di p53 predomina in una cellula resistente allo stress ossidativo.

Di interesse più recente, è stata riportata una correlazione tra resistenza allo stress ossidativo e resistenza alla chemioterapia. Infatti, molti agenti chemioterapici inducono apoptosi *via* stress ossidativo (77, 78). Poiché l'esposizione ad agenti che inducono i ROS può comportare la selezione di cloni resistenti allo stress, questo evento potrebbe contribuire alla resistenza delle cellule neoplastiche alla chemioterapia.

Un altro sistema implicato nella resistenza allo stress ossidativo è quello che coinvolge il fattore trascrizionale Nrf2 (NF-E2-related factor 2) (79). Questo fattore induce la trascrizione di numerosi geni che codificano per proteine con funzione antiossidante, quali superossido dismutasi, catalasi, perossiredossina 1, eme-ossigenasi 1, ferritina, glutatione perossidasi, tioredossina (23, 80, 81, 82, 83, 84). Inoltre esso regola l'espressione della famiglia di enzimi della glutatione S-trasferasi (GST), che catalizzano la coniugazione degli xenobiotici al glutatione (GSH), dell'NAD(P)H chinone ossidoreduttasi e di altri geni che codificano per enzimi della detossificazione. Infine, Nrf2 controlla sia l'induzione che il livello basale dell'espressione di geni che codificano per

enzimi coinvolti nella biosintesi del GSH. In seguito a questa regolazione così ampia di geni, tale sistema potrebbe rappresentare un meccanismo con cui la cellula si può pre-adattare ad uno stato di resistenza allo stress ossidativo e probabilmente alla chemioterapia (82).

1.4 Nrf2 e la risposta allo stress ossidativo

La risposta cellulare allo stress ossidativo può essere suddivisa in tre fasi. Durante la prima fase un fattore cellulare agisce come “sensore” e percepisce un segnale del cambiamento dello stato redox della cellula. Durante la seconda fase il sensore trasduce il segnale al macchinario della trascrizione. Nella terza fase, il segnale attiva fattori di trascrizione che inducono l'espressione di un gruppo di geni correlati allo stress ossidativo, coinvolti nella protezione cellulare. Questo processo è altamente controllato attraverso la funzione coordinata di molti fattori di regolazione. (23, 24, 25, 29, 85).

In difesa dello stress ossidativo gli organismi viventi hanno sviluppato molti sistemi di risposta tra cui quello che coinvolge il fattore trascrizionale Nrf2 (NF-E2-related factor 2) (23, 79). Questo fattore induce la trascrizione di geni che codificano per proteine coinvolte nelle difese antiossidanti e per enzimi di fase 2 implicati nella detossificazione degli xenobiotici. Gli enzimi di fase 2 catalizzano la coniugazione degli xenobiotici ad un substrato endogeno solubile in ambiente acquoso, quale ad esempio il glutathione (GSH), l'acido UDP-glucuronico o la glicina. Quantitativamente, la maggiore reazione di detossificazione di fase 2 è rappresentata dalla coniugazione al GSH, che è catalizzata da una famiglia di enzimi denominati glutathione-S-trasferasi (GST) (86). Inoltre Nrf2 controlla l'espressione del gene della gamma-glutamylcisteilglicina sintetasi (γ -GCS) (87), un enzima che regola la quantità di GSH, e del gene x-CT che codifica per una componente proteica del sistema eterodimerico di trasporto cistina/glutammato (88), che anche contribuisce al mantenimento dei livelli intracellulari di GSH.

Nrf2 appartiene ad una famiglia di proteine che comprende 4 membri: p45 NF-E2, Nrf1, Nrf2 e Nrf3 che possiedono un motivo di legame al DNA del tipo cerniera di leucina con un dominio basico adiacente (bZIP), comunemente riferito Cap'n'collar (89). Nrf2 è un potente attivatore trascrizionale e funziona

legandosi ad un elemento di sequenza chiamato “antioxidant/electrophile responsive element” (ARE/EpERE) presente, talvolta anche in copie multiple, sul promotore dei geni da esso regolati (23, 85, 90, 91). Nrf2 funziona come eterodimero con una delle proteine che appartengono alla classe delle piccole proteine della famiglia Maf. Infatti, è stato recentemente dimostrato *in vivo* che tali proteine sono richieste per l’attività transattivante di Nrf2 (89). Inoltre altre proteine quali c-Jun (92) e ATF4 (93) possono agire come molecole partner di Nrf2.

L’attività di legame alle sequenze ARE di Nrf2 può essere antagonizzata da una proteina chiamata Bach1, capace di funzionare da “competitore” per le sequenze ARE specialmente per il gene dell’eme-ossigenasi 1 (94). Bach1 pur possedendo un motivo a cerniera di leucine, manca del motivo di legame al DNA e in questo modo impedisce il legame di Nrf2 alla sequenze ARE dei promotori.

L’attività di Nrf2 è regolata a vari livelli e con diversi meccanismi (23). Tra questi quello meglio studiato è il sistema Nrf2/Keap1 (vedi Figura 2 e ref 23).

Tale meccanismo di regolazione si basa sulla disponibilità nucleare di Nrf2 stesso. Infatti, come si evince dalla Figura 2, Nrf2 normalmente è sequestrato nel citoplasma perché legato a Keap1, una proteina del citoscheletro che interagisce direttamente con l’actina (95). In questo contesto citoplasmatico, Nrf2 viene continuamente degradato attraverso un sistema di ubiquitinazione che “marca” la proteina e la dirige al proteasoma 26S (96). Recentemente è stato dimostrato che Keap1 si lega a Cul3, una proteina che fa parte del sistema dell’ubiquitinazione, partecipando direttamente quindi alla degradazione di Nrf2 (97).

Quando venne chiarito che Nrf2 era un attivatore trascrizionale di geni coinvolti nella regolazione degli enzimi di fase 2, fu pensato che esso regolasse relativamente pochi geni. In realtà da studi *in vivo*, condotti su topi in cui è stato inattivato il gene che codifica per Nrf2, è stato visto che il numero di geni regolati da Nrf2 è elevato, maggiore di 200. Questi geni possono essere indotti da stress ed agenti di varia natura e possono essere classificati in varie categorie come viene illustrato nella seguente tabella:

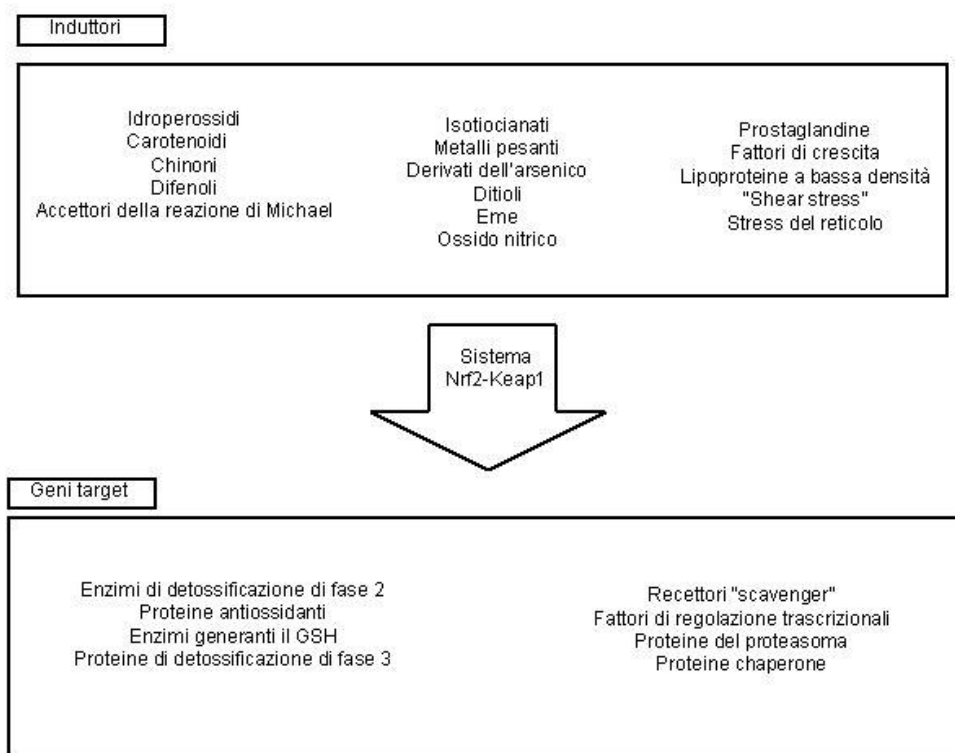


Tabella 1 *Induttori e geni bersaglio del sistema di regolazione Nrf2/Keap1*

Nrf2 svolge un ruolo critico nella regolazione dell'espressione dei geni che codificano per la famiglia delle GST e per l'NAD(P)H chinone ossidoreduttasi (23). Inoltre esso controlla i geni che codificano per altri enzimi detossificanti della fase 2, quali l'UDP glucoronil-trasferasi 1A6, l'aldeide reduttasi e l'idrolasi microsomale degli epossidi. In aggiunta anche l'induzione di geni per proteine antiossidanti in seguito allo stress ossidativo, dipende da Nrf2. Le maggiori proteine sono: l'eme-ossigenasi 1, la perossiredossina 1, la superossido dismutasi, la catalasi, la glutathione perossidasi, la tioredossina (23). Nrf2 controlla sia l'induzione che il livello basale dell'espressione di geni che codificano enzimi coinvolti nella biosintesi del GSH, in particolare il gene che controlla l'espressione della γ -GCS, un enzima che regola la quantità di GSH. Un altro gene implicato nel mantenimento dei livelli intracellulari di GSH, e regolato da Nrf2, è il gene x-CT (88), che codifica per una subunità del trasportatore proteico dimerico cistina/glutammato. Altri enzimi coinvolti nella detossificazione degli xenobiotici coniugati a GSH sono comunemente

designati enzimi di fase 3 e provvedono ad espellere dalla cellula i prodotti coniugati. Molti dei geni di questi enzimi sono regolati da Nrf2 (23).

Inoltre la proteina associata alla multi-resistenza a farmaci è anch'essa indotta in maniera Nrf2-dipendente (98) e l'induzione di CD36, un gene che codifica per un recettore "scavenger" che media l'ingresso nella cellula di proteine ossidate a bassa densità è regolata da Nrf2 (99).

Nrf2 sembra inoltre regolare la sua stessa espressione attraverso alcune sequenze ARE-simili (100) e quella di altri fattori trascrizionali, comprese proteine regolatorie dei geni della fase 2.

Esistono evidenze che la maggior parte delle subunità del proteasoma 26S sono indotte in maniera Nrf2-dipendente (101, 102). Da notare che l'induzione del proteasoma 26S potrebbe rappresentare un modo efficiente per la cellula di sopravvivere a condizioni di stress di varia natura e che collettivamente potrebbero contribuire a malattie croniche.

Infine, la classe delle proteine "Heat-shock" viene indotta con un meccanismo Nrf2-dipendente (102). L'accumulo infatti di polipeptidi non correttamente ripiegati in seguito allo stress ossidativo potrebbe disturbare le normali funzioni cellulari. Queste proteine chaperone, insieme al sistema del proteasoma, giocano un ruolo essenziale in risposta allo stress attraverso il riparo e la rimozione di proteine danneggiate.

Va osservato che i meccanismi molecolari che regolano il sistema Nrf2/Keap1 sono risultati conservati tra i vertebrati (23), indicando un ruolo fondamentale di tale sistema nel corso dell'evoluzione.

Va notato che l'attivazione della trascrizione dei geni antiossidanti e di quelli di fase 2 o l'espressione costitutiva elevata di questi geni può rendere la cellula più resistente a potenziali cambiamenti di un successivo stress anche di maggiore entità. Si può quindi ipotizzare che una deregolazione del sistema Nrf2/Keap1 può essere alla base della selezione di cellule resistenti allo stress ossidativo.

1.5 p53 nelle funzioni cellulari

p53 fu scoperto indipendentemente da David Lane e Arnold Levine nel 1979 come una proteina cellulare in complesso con il large T antigen (LT) di SV40. Il suo cDNA fu isolato solo più tardi, e consistente con la sua associazione con T

antigen, fu riportato che p53 coopera con altri prodotti di oncogeni in saggi di trasformazione in vitro (104 e referenze contenute in essa). Inoltre poiché p53 è iperespresso in linee cellulari di carcinoma umano fu pensato che p53 fosse “bona fide” un oncogene. Solo nel 1989 Vogelstein suggerì che p53 era un soppressore di tumore. Infatti fu subito dimostrato che il locus di p53 (TP 53) era spesso mutato nei tumori (104). Attualmente è noto che le mutazioni a carico di p53 sono presenti nel 50% dei tumori (28). Inoltre è stato visto che i topi deficienti di p53 sono estremamente prone al tumore e che il cancro ereditario Li-Fraumeni è dovuto ad una mutazione della linea germinale nel locus TP53. L’interesse suscitato da p53 è dimostrato dall’enorme numero di pubblicazioni accumulato in questi anni.

La proteina p53 in quanto soppressore di tumore svolge un ruolo centrale nella risposta cellulare ad una varietà di stress ambientali e intracellulari, incluso agenti che causano danni al DNA, stress ossidativo, ipossia e alterazioni della proliferazione cellulare indotti dall’attivazione di oncogeni o dalla trasformazione virale (105). Le cellule che possiedono p53 funzionante rispondono a tali stress attivando un programma di arresto del ciclo cellulare oppure di apoptosi. In caso di mancata funzione di p53, questa coordinazione viene meno con conseguente crescita cellulare non controllata.

I diversi segnali di stress vengono trasdotti principalmente attraverso la capacità di p53 di agire come fattore trascrizionale che è in grado di regolare l’espressione di numerosi geni che controllano la progressione attraverso il ciclo cellulare, l’induzione dell’apoptosi, il riparo del DNA e altre funzione coinvolte nella risposta cellulare agli stress (106).

Normalmente, la proteina p53 nelle cellule di mammifero, in assenza di stress sia genotossici che non, è presente a bassi livelli ed ha un’emivita molto breve (6-20 minuti) (107, 108). In seguito a stress, si ha accumulo marcato e attivazione della proteina p53.

Il processo di regolazione di p53 può essere diviso fondamentalmente in tre fasi: la fase di attivazione, la fase effettrice e la fase finale anche se alcuni dividono ulteriormente quest’ultima fase.

La fase di attivazione

In seguito ad un segnale di stress, per poter attivare una risposta biologica efficiente, i livelli di p53 devono raggiungere un certo livello e la sua attività

specifica deve anche essere incrementata. I bassi livelli di p53 sono dovuti alla continua degradazione da parte del proteasoma 26S, mediante un processo guidato dall'ubiquitinazione in diverse lisine della regione C-terminale di p53, ad opera del complesso Mdm2-E3. E' quindi possibile che i bersagli principali delle vie di trasduzione di segnali più frequenti siano quelli che contrastano l'attività di Mdm2. Ciò spesso avviene attraverso qualche modificazione post-trasduzionale, che comporta la stabilizzazione diretta di p53, ma che potrebbe anche conferire a p53 alcune proprietà speciali. Tuttavia in alcuni casi p53 è stabilizzato e attivato anche senza evidenti modificazioni post-traduzionali (110). Inoltre la natura delle modificazioni dipende, per alcuni versi, da segnali a monte. Alcuni residui sembrano essere sempre modificati in risposte a diversi stress, come la Ser 15 di p53 umano (111, 112), mentre altri risultano più ristretti come la Ser 392, che per esempio non viene modificata in risposta ad agenti che provocano danno al DNA con rottura del doppio filamento. Sono state identificate diverse chinasi che vengono attivate in seguito a stress genotossici e che iniziano la cascata di segnali attraverso l'attivazione di p53. In particolare, la proteina chinasi ATM è stata implicata nella via di segnalazione di danni dovuti ad esposizioni a radiazioni ionizzanti (IR) (112) mentre le radiazioni UV-C promuovono l'attivazione della proteina chinasi ATR (A-T and Rad3-related), appartenente alla famiglia delle PI-3 chinasi (113).

Quanto queste modificazioni siano importanti per l'attività di p53 non è chiaro, visto che ci sono esempi dove l'iperespressione di p53 può superare la necessità di modificazioni aggiuntive e, in alcuni casi, ma non in tutti, topi transgenici con modificazioni a carico dell'aminoacido, hanno lo stesso comportamento di topi normali.

Sono state documentate anche numerose e varie modificazioni dei residui del C-terminale, che comprendono acetilazione, ubiquitinazione, sumoilazione e neddilazione. E' stato dimostrato che la proteina p53 umana è modificata post-traduzionalmente in almeno 18 siti. Sebbene le modificazioni post-traduzionali nella maggior parte dei siti avvengono in risposta a vari stress genotossici, esistono differenze in particolari siti in risposta ai vari agenti (114, 115).

La fase effettrice

Una volta attivata, p53 può iniziare ad indurre la risposta cellulare. Dati strutturali, supportati da varie linee di ricerca, dimostrano che p53 è un fattore

trascrizionale sequenza-specifico. Comunque ci sono ulteriori dati che mostrano che p53 ha anche attività trascrizione-indipendente (46).

In accordo con la regolazione trascrizionale, p53 “decide” quali geni vanno attivati (o repressi), analizzando 3x10⁹ paia di basi nel mezzo del complesso cromatinico, individua il suo sito di legame e interagisce con il “core” della macchina trascrizionale per iniziare la trascrizione.

Tuttavia non sono noti i meccanismi con cui p53 può scegliere promotori differenti in situazioni diverse, come co-regola geni della sua stessa famiglia, p63 e p73, come reprime altri geni, ma soprattutto come p53 decide per una via o un'altra.

Oltre alle modifiche post-traduzionali, un ruolo importante, è svolto dalle interazioni di p53 con altre proteine cellulari, e i due meccanismi non sono mutuamente esclusivi. La lista delle proteine cellulari che interagisce con p53 è ampia (maggiore di 80) ed è quindi difficile razionalizzare come p53 può rispondere e interagire con una di queste. Probabilmente, queste interazioni sono transienti e molto dipendono dalla natura dei segnali a monte e dal tipo cellulare. Infatti tali interazioni giocano un ruolo determinante nella decisione se p53 induce un arresto del ciclo cellulare o apoptosi (103). Inoltre alcune interazioni proteiche disattivano p53 (almeno come fattore trascrizionale), ma altre impongono cosa può fare p53, cioè queste proteine si comportano come cofattori (45, 103)

La fase finale

La maggiore attenzione è stata posta nei confronti dei due meccanismi di p53 più conosciuti, l'arresto reversibile del ciclo cellulare e l'apoptosi. In alcuni casi l'arresto del ciclo cellulare diventa permanente e indistinguibile dalla senescenza cellulare (35). Tutte queste funzioni di p53 contribuiscono all'attività di p53 come soppressore di tumore, sebbene ci sono evidenze che dimostrano che *in vivo* l'apoptosi è la funzione più importante di p53. (115).

Come guardiani del genoma, p53 è capace di indurre un “blocco di emergenza” del ciclo cellulare per impedire alle cellule il cui DNA è stato danneggiato, di propagare alle generazioni successive potenziali alterazioni genetiche. Diversi approcci genomici hanno dimostrato che p53 induce o inibisce più di 150 geni che mediano l'arresto del ciclo cellulare in uno dei maggiori punti di controllo, in G1 prima della fase S, oppure in G2 prima della mitosi cellulare (108).

L'arresto del ciclo cellulare da parte di p53 avviene soprattutto in seguito all'attivazione trascrizionale del gene CDKN1A che codifica per p21^{WAF1/CIP1}, un inibitore generale delle chinasi ciclino-dipendenti (CDK) (116). Ciò blocca l'attività delle CDKs nel complesso delle ciclina D ed E, necessarie per la progressione del ciclo cellulare, con arresto del ciclo in G1. Blocco del ciclo cellulare può avvenire anche attraverso attivazione dei geni GADD45 (117) e 14-3-3 σ che provocano un blocco del ciclo G2/M (118).

E' molto meno chiaro dell'arresto del ciclo cellulare come p53 favorisce il processo dell'apoptosi. Alcune evidenze suggeriscono che nel contesto di tale processo, p53 svolge la sua funzione come fattore di trascrizione; tuttavia l'identificazione di geni bersaglio "chiave" non è completa e nuovi geni continuano ad essere identificati. Tra i geni pro-apoptotici attivati da p53 ci sono BAX, NOXA, PUMA, BID, CD95, APAF-1, DR5, AIP1 (119 e referenze contenute in essa). A parte il ruolo trascrizionale nel nucleo, p53 nel citoplasma interagisce direttamente con alcune proteine con dominio BH3 con funzione anti-apoptotica (ad esempio Bcl2) o pro-apoptotica per regolare a livello della membrana mitocondriale il rilascio del citocromo c (46). E' interessante notare in questo contesto che l'apoptosi indotta da p53 dipende almeno in parte dall'accumulo di ROS. Infatti un gruppo di geni indotti da p53 e definiti *PIG* (*p53 induced genes*) codificano per proteine la cui attività provoca un aumento dei ROS intracellulari (120).

Accanto ai geni *PIG*, p53 induce anche geni con funzione antiossidante, tra cui il gene della glutatione perossidasi (121) e le sestrine Hi95 (122) e PA26 (123) che abbassano i livelli dei ROS nella cellula in condizioni di stress fisiologico non letale (76).

Un altro potenziale ruolo di p53 è la regolazione della ricombinazione del DNA e della stabilità genetica, che sono importanti per la tumorigenesi e per il riparo del DNA (124)

1.6 p53 come repressore trascrizionale

L'elemento di riconoscimento *consensus* di p53 (RE) sul DNA del gene regolato da p53 si trova nell'ambito di poche migliaia di basi rispetto al sito di inizio della trascrizione oppure nel primo o secondo introne. Esso consiste di

due coppie (half-sites) di cinque basi posizionate testa-testa (5'-PuPuPuC(A/T)(A/T)GPyPyPy-3' (Pu è una purina, Py è una pirimidina) separate tra loro da 0-13 nucleotidi (125). Le sequenze all'interno dei pentameri e gli orientamenti influenzano sia il legame che l'attività di p53. Ad esempio, una sequenza è forte se contiene C e G, nessuna oppure 1 sola base nella sequenza spaziatore, non più di 3 basi consensus nel sito. Comunque p53 può riconoscere anche sequenze che talvolta differiscono dalla consensus (36) e ciò spiegherebbe perché i livelli di attivazione da parte di p53 sui geni a valle sono così diversi.

La proteina p53 attiva nella cellula consiste di un tetramero formato da quattro subunità identiche e la tetramerizzazione è fondamentale per la sua funzione, in quanto solo la forma tetramerică è attiva come fattore trascrizionale. Ogni monomero è un polipeptide di 393 aminoacidi in cui si possono individuare 3 domini funzionali diversi: un dominio N-terminale di transattivazione (TAD) (a.a. 1-101), un dominio centrale di legame al DNA (DBD) (a.a. 102-292) e un dominio C-terminale (CTD) (a.a. 293-393) (126).

Il dominio TAD è caratterizzato da un dominio di transattivazione "acidico" con residui di glutammico e aspartico e da un dominio ricco di residui di prolina (126). E' interessante notare che il legame di MDM2, il regolatore negativo di p53, avviene in tale regione.

Il DBD possiede delle regioni conservate cruciali per l'interazioni tra p53 e il DNA. La maggior parte del dominio DBD si organizza in una conformazione a foglietto beta con catene antiparallele che costituiscono l'elemento portante del dominio di legame al DNA formato da due anse tenute insieme da un atomo di zinco coordinato a tre cisteine e ad una istidina (126).

Il dominio C-terminale possiede una regione basica di legame al DNA. Questa regione inizialmente venne postulata con attività di repressore nei confronti dell'attività di DBD. In realtà studi recenti suggeriscono che tale repressione serve a facilitare l'attività di legame specifico di DBD sul genoma e quindi TD svolge una funzione regolatoria. Inoltre tale regione è essenziale per la tetramerizzazione di p53.

Per promuovere la trascrizione, p53 segue diversi meccanismi molecolari. Il primo assume che la regione del promotore del gene che viene attivato da p53, generalmente non è accessibile ai fattori generali della trascrizione e all'RNA

polimerasi. In questo scenario, il legame di p53 all'interno del promotore potrebbe facilitare l'apertura reclutando sia fattori di rimodellamento della cromatina (CRF) (127) che istone transacetilasi (HAT) (128) in particolare CBP/p300 e/o metiltrasferasi quali ad esempio PRMT1 e CARM. Un altro meccanismo di attivazione prevede che p53 facilita la formazione del complesso di preinizio attraverso interazione diretta con i componenti del mediatore (128). Infine p53 può stimolare la trascrizione favorendo il reclutamento di fattori basali della trascrizione, come TFIIA, TFIID (36)

Nonostante p53 viene spesso descritto come attivatore trascrizionale, è stato dimostrato che esso può sopprimere la trascrizione di alcuni geni (130). È stato suggerito che la repressione trascrizionale da parte di p53 di geni anti-apoptotici svolge un ruolo chiave nella regolazione dell'apoptosi (36).

Il meccanismo molecolare della regolazione negativa della trascrizione da parte di p53 sembra essere diverso dall'attivazione (131, 132 e referenze contenute in esse). Innanzitutto, p53 può inibire la trascrizione dei geni trascritti dalla RNA Polimerasi I, dalla RNA Polimerasi II e dalla RNA Polimerasi III.

Riguardo all'inibizione della RNA Polimerasi II, sono stati proposti sinora cinque meccanismi di repressione che vengono schematizzati nella Figura 3 (adattata da ref 132)

Il primo meccanismo prevede che la repressione p53-dipendente avviene senza legame di p53 ad elementi di sequenza del DNA. In tale contesto, gli attivatori della macchina basale della trascrizione vengono inibiti via interazione diretta con p53, prevenendo così l'attivazione trascrizionale del gene a valle (Figura 3-a, 133, 134).

Il secondo meccanismo prevede che l'attività di repressione p53-dipendente si svolge mediante spiazzamento degli attivatori trascrizionali dei geni dai rispettivi siti di legame o dai siti di legame al DNA che contengono una sequenza che si sovrappone con quella di p53 (Figura 3-b 135, 136).

Il terzo meccanismo prevede che p53 reprime i geni bersaglio mediante interferenza diretta con l'assemblaggio della macchina trascrizionale. (Figura 3-c, 135, 136, 137).

Il quarto meccanismo implica che p53 reprime il promotore attraverso il reclutamento delle istone deacetilasi (HDAC) e possibilmente di altri fattori di

rimodellamento della cromatina che agiscono nella modificazione degli istoni provocano una chiusura della cromatina stessa (Figura 3-d, 138)

Infine, il quinto meccanismo prevede che l'inibizione del gene avviene attraverso il legame di p53 a nuovi elementi di sequenza (rappresentati in Figura 3 con un colore diverso) che comporta una architettura particolare con funzione repressoria sulla trascrizione (Figura 3-e 139).

Nel caso della repressione del gene della elicasi RECQ4 è stata descritta una combinazione di due dei suddetti meccanismi (140).

Va inoltre sottolineato che la repressione trascrizionale p53-dipendente, basata sul reclutamento delle HDAC, ha forse lo scenario più complesso ed in alcuni casi è mediata dalla presenza di altre proteine. I mediatori noti sono mSin2a (138, 141), SnoN (142) e p52 (143).

In alcuni casi la repressione indotta da p53 sembra essere dipendente dall'attivazione di alcuni geni bersaglio di p53. L'inibizione di Chk1, Cdc2, Ciclina A2, survivina e altri geni sembra avvenire indirettamente attraverso l'attivazione della trascrizione di p21 (144). In tali casi p21 da solo è sufficiente ad inibire la trascrizione allo stesso livello di p53.

Qualunque sia la natura della repressione p53-dipendente, essa richiede che p53 sia attivo e funzionante. Infatti mutazioni in quasi tutti i domini di p53 (TA, DBD, CTD) possono abrogare l'effetto inibitorio di p53, suggerendo un ruolo specifico di essi nel meccanismo inibitorio di p53. Ad esempio mutazioni nel TA impediscono a p53 di reprimere la trascrizione del gene Map4, una proteina associata ai microtubuli (144). Un p53 mutante che manca della regione ricca in prolina del TA, non è in grado di reprimere efficientemente alcuni geni antiapoptotici come p53 normale (145). Questo dominio risulta anche importante per la repressione mediata da mSin3a (138). La regione C-terminale è richiesta per l'interazione tra la proteina Ets-1, che è necessaria per la repressione del gene della trombassani sintasi (TXSA) (146).

E' interessante che per la repressione venga richiesto un DBD funzionalmente attivo anche quando il legame di p53 al DNA non è necessario. In questo contesto va notato che i promotori di alcuni geni che sono repressi posseggono uno o più elementi responsivi a p53, che però non partecipano alla regolazione mediata da p53 (146, 147). Il promotore del gene del piccolo RNA nucleare U1 contiene un p53-RE ad alta affinità che tuttavia non è indispensabile per la

repressione di U1 mediata da p53 (147). Resta da investigare se il riconoscimento di tali RE “latenti” dipende da condizioni intracellulari e/o stimoli esterni.

Recentemente è stata descritta repressione trascrizionale per il promotore del gene MDR1, che implica un legame di p53 ad un sito “RE di repressione”, (139). E’ di interesse notare che l’orientamento dei pentameri è del tipo “testa-coda” invece di “testa-testa”, e ciò stabilisce il tipo di attività di p53 su questo promotore. Infatti il cambiamento dell’orientamento verso la condizione testa-testa “normale” comporta un’attivazione significativa del gene di MDR1. Gli stessi autori propongono che l’inibizione di diversi altri geni e cioè di ciclina A, ciclina B1, e ARF possano essere regolati dallo stesso meccanismo in quanto sono stati identificati RE testa-coda identici nell’ambito del loro promotore (148).

Considerando che l’attività di geni repressi da p53 usualmente è correlata a proliferazione cellulare o progressione maligna, non è sorprendente che p53 possa anche sopprimere tali attività in un modo più generale attraverso il “targeting” dei componenti della macchina della sintesi proteica: p53 fa ciò attraverso inibizione dell’espressione dei geni trascritti da Polimerasi I e Polimerasi III (149, 150). La trascrizione diretta da Polimerasi I è repressa in quanto p53 interferisce con l’assemblaggio di un complesso di inizio produttivo sul promotore degli RNA ribosomali, mentre la trascrizione dei tRNA sembra essere repressa direttamente attraverso interazione con i componenti della macchina trascrizionale di Polimerasi III e indirettamente attraverso un meccanismo di degradazione p53-dipendente di TFIIB (151). A dimostrazione di ciò, la sintesi degli RNA ribosomali e dei tRNA è aumentata in fibroblasti di topo knockout per p53 (152).

1.7 Il dietilmaleato (DEM) genera condizioni proossidanti nella cellula

Per alterare le condizioni redox della cellula in modo da poter studiare la risposta allo stress ossidativo, possono essere usati diversi composti e sistemi sperimentali. Il più comune agente ossidante usato è il perossido d’idrogeno (H₂O₂). Altri ossidanti come il paraquat e i chinoni possono generare ROS in presenza di O₂. Un altro modo per sottoporre la cellula a stress ossidativo è

quello di manipolare i sistemi “scavengers” dei ROS, determinando così un accumulo intracellulare dei radicali liberi dell’ossigeno. Come già detto, il sistema del GSH è fondamentale per mantenere l’omeostasi redox della cellula e perciò un agente capace di modificare il rapporto GSH/GSSG può risultare molto utile per studiare i meccanismi molecolari coinvolti nella regolazione redox delle cellule. Numerose molecole consentono di raggiungere tale obiettivo, ciascuna delle quali attraverso uno specifico meccanismo d’azione: la BSO (butionina sulfossimina) inibisce la γ -glutamylcisteina sintetasi (primo enzima della biosintesi del GSH), la diamide ossida i gruppi tiolici, l’N-etilmaleimide li alchila.

Un altro composto che altera il rapporto GSH/GSSG è il dietilmaleato (DEM), che forma coniugati col GSH in una reazione catalizzata dalla glutathione S-trasferasi. Il DEM abbassa il rapporto GSH/GSSG determinando quindi un accumulo di ROS e ciò crea stress ossidativo. Infatti, una concentrazione di DEM pari a 1 mM riduce i livelli di GSH del 50% circa già dopo 30 minuti di trattamento. Il DEM agisce quindi come ossidante indiretto a differenza di molecole come l’H₂O₂ che “direttamente” è capace di produrre un danno ossidativo nella cellula. Se infatti l’H₂O₂ viene aggiunta in vitro a proteine purificate, essa ne altera alcune funzioni biologiche. In accordo quindi con un’azione ossidativa indiretta l’incubazione con DEM di estratti proteici cellulari, invece, non determina alcun effetto ossidante sulle proteine. Infine l’impiego del DEM presenta altri vantaggi: bassa tossicità in quanto blando ossidante (il danno prodotto dall’H₂O₂, a parità di concentrazione, è di due ordini di grandezza maggiore), reversibilità degli effetti (la rimozione del DEM dal mezzo di coltura ripristina completamente le funzioni biologiche), azione ossidante indiretta e prevenuta dal pretrattamento con NAC (N-acetil-cisteina), diretto precursore del GSH.

Nel nostro laboratorio per indurre variazioni dell’ambiente redox in varie condizioni cellulari viene utilizzato il DEM. Negli ultimi anni abbiamo dimostrato che il DEM, utilizzato a basse dosi, per un tempo prolungato di sei giorni su cellule primarie di origine umana, è capace di indurre un fenotipo senescente (153). Tuttavia, la stessa concentrazione di DEM, su cellule murine immortali NIH3T3 attiva un programma apoptotico già a poche ore dall’inizio del trattamento (154).

1.8 Scopo della ricerca

Nonostante i notevoli progressi fatti negli ultimi anni nella comprensione degli effetti delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) sulle cellule e sulla fisiologia animale, numerosi punti restano ancora oscuri. Uno di questi riguarda i meccanismi molecolari che sono alla base della selezione di cellule resistenti allo stress ossidativo.

L'interesse sviluppato in questo campo negli ultimi anni è stato notevole in quanto la resistenza allo stress ossidativo è correlata all'invecchiamento, al cancro e alla resistenza alla chemioterapia. Numerosi studi indicano che la generazione di cellule resistenti allo stress ossidativo comporta un programma specifico e complesso di espressione genica che si realizza attraverso l'attivazione o la repressione di numerosi geni bersaglio. Studi recenti indicano un ruolo di alcune proteine cardine tra cui p53 e Nrf2, che mediano, con meccanismi ancora sconosciuti, la comparsa di un fenotipo resistente allo stress. Tuttavia i meccanismi molecolari con cui tali proteine possono mediare questo programma genico non è stato ancora compreso.

Scopo della presente tesi è stato quello di studiare i meccanismi molecolari che sono alla base della regolazione delle funzioni cellulari che conducono alla resistenza allo stress ossidativo.

Nel contesto di tale lavoro è stato condotto uno studio rivolto ad esplorare: i) il profilo di geni antiossidanti in cellule resistenti all'apoptosi indotta dallo stress ossidativo; ii) i relativi meccanismi di regolazione trascrizionale; iii) i possibili effetti della proteina p53 sull'espressione di alcuni geni antiossidanti.

2. MATERIALI E METODI

2.1 *Culture cellulari*

Le colture cellulari utilizzate in questo lavoro sono rappresentate dalle cellule NIH3T3, fibroblasti embrionali di topo e dai cloni da esse derivate (NIH-DEM-3, NIH-DEM-5, NIH-DEM-12, NIH-DEM-21); cellule Hepa 1-6; derivate da epatocarcinoma di topo; cellule Calu-6 derivate da carcinoma polmonare umano; cellule Saos-2, derivate da osteosarcoma umano; cellule Hek 293 derivate da carcinoma di epitelio renale embrionale umano; infine due linee cellulari derivate da carcinoma di colon umano: le HCT 116 +/+ in cui p53 è funzionante e normale e le HCT 116 -/- in cui p53 è stato inattivato per ricombinazione somatica (28). Le cellule NIH3T3 e i cloni sono state cresciute in mezzo Eagle modificato secondo Dulbecco (DMEM) in 10% di Calf Serum e con 100 Unità/ml di penicillina e 100mg/ml di streptomicina. Le cellule Hepa 1-6, e le Saos-2 e le HCT116 in mezzo Eagle modificato secondo Dubelcco (DMEM), supplementato di FBS 10% con 100 Unità/ml di penicillina e 100mg/ml di streptomicina (Biowhittaker). Le cellule Calu-6 sono state coltivate in mezzo Eagle modificato secondo Dubelcco (DMEM), supplementato di FBS 10% con 100 Unità/ml di penicillina e 100mg/ml di streptomicina e con 2 mM di L-glutamina e 0,1 mM di aminoacidi non essenziali. Tutte le cellule sono state cresciute a 37° C in un'atmosfera di CO₂ al 5%.

2.2 Estrazione dell'RNA e reazione della trascrittasi inversa

L'RNA totale è stato isolato dalle cellule usando l'Rneasy Mini Kit (Qiagen) secondo le istruzioni suggerite dalla casa di produzione. In breve, le cellule venivano lavate in PBS 1x, lisate nel tampone della casa e il lisato veniva quindi passato sulle colonne di estrazione. L'RNA veniva eluito dalla resina con H₂O a 65°C e quantizzato mediante misura delle OD allo spettrofotometro. Per un'analisi della qualità veniva effettuato un gel di agarosio in condizioni denaturanti con formaldeide.

La reazione della trascrittasi inversa veniva effettuata su 1µg di RNA totale per ogni campione, nell'apparecchio Gene AMP PCR sistem 9700. La reazione avveniva in tampone II di PCR (Perkinelmer) diluito a 1x, contenente MgCl₂ 5 mM, DTT 10 mM, esameri random 5 µM, dNTP 1 mM, inibitore dell'RNasi alla concentrazione finale di 1 U/µl e trascrittasi inversa alla concentrazione finale di 10 U/µl. Dopo denaturazione dei campioni a 70°C per 10 minuti, si procedeva alla seguente reazione:

-25°C per 10 minuti per la reazione di “annealing” degli esameri

-42°C per 45 minuti per la reazione di polimerizzazione della trascrittasi inversa

-99°C per 3 minuti per l'inattivazione enzimatica e la degradazione dell'RNA

Un'aliquota del prodotto di reazione, cDNA a singolo filamento, veniva utilizzato come tale negli esperimenti PCR real-time quantitativa.

2.3 PCR real-time quantitativa

La reazione di PCR real-time quantitativa veniva condotta nell'apparecchiatura iCYCLER SYSTEM fornito di OPTICAL SYSTEM (Biorad). La reazione di PCR veniva effettuata utilizzando un'aliquota, pari ad 1/10, del prodotto della reazione della trascrittasi inversa. Le condizioni della reazione prevedevano un ciclo di reazione a 95°C per 5 min (attivazione dell'enzima Taq Polimerasi) e 40 cicli con 15 secondi a 95°C e 1 minuto a 60°C (cicli di annealing e di amplificazione). La metodica scelta per la quantizzazione del prodotto di PCR è stata quella del Sybr Green, un colorante che lega specificamente al DNA a doppio filamento ed emette fluorescenza. Tale fluorescenza, proporzionale alla quantità di DNA bersaglio amplificata, veniva raccolta dalla macchina durante ogni ciclo di amplificazione, ad intervalli di millisecondi (da ciò il fatto che questa PCR viene denominata “real-time”). Il segnale di fluorescenza, accumulato durante i cicli di PCR in modo proporzionale alla concentrazione dei prodotti di amplificazione, definisce per ogni gene il “ciclo soglia” o Ct, cioè il numero di cicli al quale la fluorescenza in un dato campione raggiunge il valore superiore al segnale di base. Questo valore di Ct è dipendente dalla quantità della sequenza bersaglio presente all'inizio della reazione ed è inversamente proporzionale alla quantità di materiale nel campione iniziale. Il

metodo utilizzato per la quantizzazione è stata l'analisi comparativa (155) utilizzando come gene di riferimento c-ABL, il cui trascritto non varia nelle nostre condizioni. L'efficienza della PCR real-time per ogni coppia di oligo veniva valutata sperimentalmente utilizzando diluizioni dell'RNA.

Il numero di volte di variazioni per un dato gene veniva ottenuto applicando l'equazione $n = 2^{(\Delta Ct_{\text{controllo}} - \Delta Ct_{\text{campione in esame}})}$. Il ΔCt controllo si ricava per differenza tra il Ct del gene in esame e quello di c-ABL nel campione controllo ($\Delta Ct_{\text{controllo}} = Ct_{\text{gene x}} - Ct_{\text{c-ABL}}$). Anche il ΔCt del campione in esame si calcola per differenza tra il Ct del gene in esame ed il Ct di c-ABL.

La reazione di PCR avveniva in 25 μ l finali di cui:

-12,5 μ l di Sybr Green PCR Master Mix 2x (Biorad)

-0,19 μ l forward primer 40 μ M

-0,19 μ l reverse primer 40 μ M

-7,12 μ l H₂O

-5 μ l cDNA. (pari a 1/10 del prodotto di retrotrascrizione)

La scelta della coppia di oligonucleotidi da utilizzare nelle reazione della PCR real time quantitativa veniva effettuata utilizzando il programma Primer Express (Perkin-elmer). Gli oligonucleotidi per i geni da noi analizzati sono i seguenti:

c-ABL-Forward: GGTATGAAGGGAGGGTGTACCA

c-ABL-Reverse: GTGAACTAACTCAGCCAGAGTGTTGA

γ -Glutamminil cisteina ligasi (Gcl) Forward: TGCGAAAAGTGCCCGT

γ -Glutamminil cisteina ligasi (Gcl) Reverse:

TGCATTCCAAAACATCTGGAAA

Glutatione perossidasi4 Forward: TTACTTAAGCCAGCACTGCTGTG

Glutatione perossidasi4 Reverse.: CCATGTGCCCGTCGATGT

Manganese superossido dismutasi (MnSOD)-Forward:

GTCGCTTACAGATTGCTGCCT

Manganese superossido dismutasi (MnSOD)-Reverse:

AGGTAGTAAGCGTGCTCCCACA

Perossiredossina5 Forward: CAGAGTTTGCCAAGAGGAATGTAA

Perossiredossina5 Reverse: GTTTCACCATTTGTAAGCATTGATGT

Glutatione S-trasferasi alfa-1 (Gst α 1)-Forward:

CAGGTGGCTCCTAGCTGCA

Glutatione S-trasferasi alfa-1 (Gst α 1) -Reverse: GGTCTGCGCCAGCTTCA
 NRF2 Forward: GGCCCAGCATATCCAGACA
 NRF2 Reverse: CCAGGGCAAGCGACTCAT
 Keap1-Forward: CCACATCTACGCAGTCGGG
 Keap1-Reverse: ACAGTTGTAACCGCGCTGAT
 x-CT (Trasportatore cistina/glutamato)-Forward:
 TACCTCAACTTTATTACTGAAGAAGTAGACAA
 x-CT (Trasportatore cistina/glutamato)-Reverse:
 TGTCAGTACGTAGCCCACTGTGA
 HO-1 (Emeossigenasi-1) Forward: GTGATGGAGCGTCCACAGC
 HO-1 (Emeossigenasi-1) Reverse: TGGTGGCCTCCTTCAAGG
 Catalase Forward: CGTCCCTGCTGTCTCACGTT
 Catalase Reverse: ATCTCCTATTGGGTTCCCGC
 NQO1 Forward: CCCTCAACATCTGGAGCCAT
 NQO1 Reverse: GCGTAGTTGAATGATGTCTTCTCTGA
 GADD45 Forward: AGACCCCGGACCTGCACT
 GADD45 Reverse: CCGGCAAAAACAAATAAGTTGACT

2.4 Plasmidi e trasfezioni

Per il clonaggio del costrutto di espressione FLAG-Nrf2, il vettore di p3x FLAG-CMV 1-1 (Sigma) e il cDNA della sequenza codificante di Nrf2 (I.M.A.G.E. 4548874) sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione EcoRV e BamHI. L'inserto è stato clonato in frame con l'epitopo FLAG (la cui sequenza è la seguente: Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-Proteina) all'estremità N-terminale. Il vettore di espressione per p53 (pCMV-p53) contiene l'intera sequenza umana wild-type inserita nel vettore pCMV Neo come descritto in riferimento 156. Le regioni del promotore di x-Ct (-235 +180) e x-CT (-235 +15) e GST α 1 (-940 +41) sono stati isolati attraverso PCR usando come stampo il DNA genomico di NIH3T3 con i seguenti primer.

x-Ct Forward 5'-CATGCAATAATAAGTATGGCCTAAGATT-3' Reverse (+15) 5'-CATTACACACCAGCTCAGC-3' e Reverse (+180) 5'-TTCCCCTTTGCTATCACCGA-3'

GST α 1 Forward 5'-CATGTGACAGGCATCTCGGA-3' Reverse 5'-CACAGGTTATAAGAGAGAACTGACCTA-3'.

La regione del promotore di NQO1 umana è stata ottenuta per PCR usando come stampo il DNA genomico delle cellule Hek 293 usando i seguenti primers: Forward 5'-TCCGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAG-3' e Reverse 5'-GGCTCTGGTGCAGTCCGGGGCGCTGATTG-3'. Le bande di PCR sono state digerite e clonate nel vettore pGL3 Basic (Promega) nei siti SacI/XhoI, a monte de gene della luciferasi.

Per le trasfezioni transienti, le cellule venivano piastrate in multiwell da sei 24 ore prima dell'esperimento e ogni trasfezione veniva eseguita in triplicato. Le cellule Hepa 1-6 e le Saos-2 venivano piastrate in numero di 230000 per trasfezione, le cellule Calu-6 in numero di 120000 e le cellule HCT116 180000 cellule per punto. Le cellule venivano trasfettate con il metodo del precipitato con Fosfato di Calcio utilizzando 2 μ g di DNA plasmidico reporter e con i vettori di espressione di p53 e/o Nrf2 (0,15 μ g ciascuno) in presenza del vettore pRLSV40 (0,2 μ g) che codifica per la luciferasi Renilla (Promega) che serviva per normalizzare. Dopo una notte di incubazione con la miscela contenente i precipitati di DNA, le cellule vengono lavate e il mezzo di coltura cambiato e dove indicato, dopo un'ora veniva aggiunta Etoposide o Cisplatino oppure DEM. Dopo 36 ore dalla trasfezione, le cellule vengono raccolte e il saggio luciferasi veniva condotto seguendo il protocollo descritto dal Dual Luciferase Reporter assay System (Promega). L'attività luciferasica veniva normalizzata utilizzando la lettura della luminescenza emessa da Renilla, con la seguente formula Firefly/Renilla x 100000.

La trasfezione delle Hek 293 veniva effettuata attraverso l'uso del reagente lipofectamina 2000 (Invitrogen) seguendo le istruzioni fornite dalla casa produttrice.

2.5 Preparazione di estratti proteici nucleari e totali per Western blot

Per la preparazione di estratti nucleari le cellule venivano lavate con PBS 1x freddo per due volte e lisate nel tampone di lisi 1x contenente 10 mM Hepes pH 7,8, 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM Na_3VO_4 , 0,2% NP40 e 10 μ g/ml degli inibitori apoproteina, leupeptina, pepstatina. Il

lisato era poi centrifugato per 5 minuti a 4°C a 2500 rpm. Il precipitato contenente i nuclei veniva lavato con il tampone di lisi senza NP40 e risospeso in 300 µl dello stesso tampone. La tappa successiva prevedeva purificazione dei nuclei su un cuscinetto di saccarosio al 30% nel tampone di lisi senza NP40 mediante centrifugazione a 6000 rpm per 15 minuti a 4°C. I precipitati nucleari erano poi risospesi in 50 µl di un tampone contenente 250 mM Tris-HCl pH 8, 60 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, e 10 µg/ml di apoproteinina, leupeptina e pepstatina. Per lisare i nuclei venivano effettuati 3 cicli di congelamento e scongelamento (-80 °C e 37 °C). Le proteine nucleari venivano infine purificate attraverso una centrifugazione a 9500 rpm per 10 minuti a 4 °C. 15 µg di proteine del sopranatante venivano separate attraverso elettroforesi su un gel denaturante di poliacrilammide al 10 % contenente SDS alla concentrazione finale dell'1% e trasferite elettroforeticamente su membrana di nitrocellulosa (Immobilon-P, Millipore). I filtri venivano preincubati per 1 ora a temperatura ambiente con una soluzione al 5% di latte in PBS 1x contenente 0,1% Tween. Successivamente si procedeva all'ibridazione dei filtri con stessa soluzione contenente l'opportuna concentrazione di anticorpo primario (1 µg/ml per anti-Nrf1 e anti-Nrf2, 0,1 µg/ml per anti-p53, 0,2 µg/ml per anti-tubulina, 0,5 µg/ml per anti-FLAG e 0,5 µg/ml anti-pATM) a temperatura ambiente per 3 ore. Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario i filtri venivano lavati tre volte per 5 minuti con una soluzione di PBS-Tween 0.1% ed incubati con l'anticorpo secondario (anticorpo secondario Proteina A Horseradish Peroxidase e anticorpo secondario anti-mouse IgG Horseradish) ad una diluizione di 1:5000 per 45' a temperatura ambiente. L'avvenuta interazione veniva visualizzata utilizzando il sistema di chemiluminescenza ECL (Amersham Pharmacia Biotech).

Gli estratti totali cellulari venivano effettuati su cellule lavate due volte con PBS 1x freddo e lisate a 4 °C per 30 minuti con un tampone fosfato contenente 0,1 mM EDTA, 1mM Na₃VO₄, 50 mM NaF, 0,5 % NP40, 1 mM PMSF e 10 µg/ml di inibitori delle proteasi: apoproteinina, leupeptina, e pepstatina. Il lisato cellulare veniva centrifugato a 4000 rpm per 10 minuti a 4 °C. 30 µg delle proteine totali del supernatante venivano utilizzati per l'esperimento di western blot secondo la procedura già descritta.

3. RISULTATI

3.1 Alcuni geni correlati alle difese antiossidanti sono iperespressi in cellule resistenti allo stress ossidativo indotto dal DEM

Nel laboratorio dove ho svolto il Corso di Dottorato di Ricerca erano state precedentemente isolate da cellule murine immortali NIH3T3 quattro linee cellulari -CL3, CL5, CL12, CL21-, capaci di sopravvivere all'apoptosi mediata dallo stress ossidativo indotto dal dietilmaleato (DEM) (154). Tali cloni erano stati caratterizzati per la crescita cellulare in presenza di stress ossidativo e per la resistenza a vari stimoli di natura apoptotica. I risultati avevano dimostrato che essi erano resistenti non solo allo stress ossidativo ma anche ad altri agenti capaci di indurre apoptosi massiva nelle cellule NIH3T3.

Per studiare il fenotipo molecolare responsabile della resistenza all'apoptosi indotta dallo stress ossidativo, abbiamo analizzato in questi cloni attraverso la metodica della PCR real time quantitativa, il profilo di espressione di alcuni geni che sono correlati alle difese antiossidanti cellulari. E' noto infatti dalla letteratura che la cellula per rispondere ad uno stress ossidativo attiva la trascrizione di più di 200 geni (23).

In particolare i geni da noi selezionati sono coinvolti in: i) metabolismo del GSH; ii) "scavenging" dei ROS; iii) risposta agli xenobiotici; e iv) meccanismo di riparo del DNA. In Figura 4 sono elencati tutti i geni di cui abbiamo analizzato il livello di espressione. Per analizzare i livelli basali dell'mRNA di ciascun gene nei quattro cloni, abbiamo deciso di utilizzare per tale esperimento cellule dei cloni resistenti cresciute per circa un mese in assenza di DEM. I risultati riportati in Figura 4 sono stati ottenuti confrontando i livelli relativi di mRNA di ciascun gene delle cellule resistenti con quelli delle cellule NIH3T3. Per la quantizzazione è stato utilizzato il metodo riportato nella referenza 155 e come gene di riferimento è stato usato c-ABL, il cui trascritto non varia nelle nostre condizioni sperimentali.

I risultati riportati in Figura 4 indicano che i quattro cloni mostrano differenze significative nel loro profilo di espressione genica. Infatti, i livelli dell'mRNA di GST α 1 che risultano iperespressi in tutti i cloni resistenti sono variabili, con un aumento che va dalle 3,7 volte nel clone NIH-DEM-21 alle 8,2 volte nelle NIH-DEM-12. In particolare nel clone NIH-DEM-21 dove c'è un minore

incremento di GST $\alpha 1$ si osserva anche iperespressione di GST p1, un altro membro della famiglia delle GST che sembra essere correlata alla resistenza ai farmaci e implicata nella regolazione delle chinasi correlate allo stress (157). Inoltre si osserva che l'mRNA del trasportatore cistina/glutammato (x-CT) (88) è aumentato in tutti i cloni tranne che nel clone NIH-DEM-3. Anche l'mRNA per la NAD(P)H chinone reduttasi (NQO1) è iperespresso in tutti i cloni tranne che nel clone NIH-DEM-5. Gli mRNA degli altri geni analizzati o sono invariati, cioè espressi allo stesso livello delle cellule parentali, oppure risultano incrementati in qualcuno dei quattro cloni. Va anche notato che nel clone NIH-DEM-5 è presente una consistente iperespressione dell'mRNA della MnSOD, i cui livelli risultano assolutamente normali in tutti gli altri cloni.

Questi dati suggeriscono che i livelli elevati di mRNA dei geni GST $\alpha 1$, x-CT e NQO1 sono associati alla resistenza allo stress indotto dal DEM. Inoltre si evince che GST p1 da sola non è efficace come GST $\alpha 1$ nel contrapporsi alla deplezione di GSH provocata dal DEM, almeno nelle condizioni sperimentali usate in questo lavoro.

3.2 Regolazione trascrizionale di Gst $\alpha 1$ e x-CT nei cloni resistenti al DEM

Sulla base dei risultati ottenuti in precedenza con la PCR Real Time si poteva concludere che la elevata espressione costitutiva dei geni GST $\alpha 1$, x-CT, NQO1, anche un mese dopo l'eliminazione del DEM dal mezzo di coltura, poteva essere responsabile dello sviluppo del fenotipo resistente al DEM nelle NIH3T3. Quindi, abbiamo deciso di investigare i meccanismi di regolazione che sono alla base della maggiore espressione di questi geni. In particolare ci siamo concentrati sui meccanismi di regolazione dei livelli elevati basali dell'mRNA di GST $\alpha 1$ e x-CT, osservati nel clone NIH-DEM-12.

Come già discusso nell'introduzione, la regolazione della trascrizione di geni specifici gioca un ruolo nella risposta cellulare allo stress ossidativo e nella resistenza da esso generata (25). L'attivazione della trascrizione di numerosi geni (87) è correlata alla presenza nei promotori di questi geni di un elemento *in cis* comune l'"Antioxidant Response Element" (ARE). Questo elemento,

talvolta presente in copia multipla nell'ambito dello stesso promotore, lega Nrf2, un membro della famiglia NF-E2 dei fattori di trascrizione bZIP (89). Nrf2, come già descritto in precedenza si lega agli ARE ed attiva la trascrizione dei rispettivi geni.

E' noto che i promotori dei geni x-CT e di GST α 1 contengono gli ARE.

Alla luce di ciò abbiamo deciso di clonare i promotori di tali geni a monte del gene "reporter" della luciferasi. In particolare, per il gene GST α 1 abbiamo clonato la regione promotrice che va da -940 a +41 coppie di basi a valle del sito di inizio della trascrizione e per il gene x-CT la regione promotrice che va da -235 a +180 coppie di basi a valle del sito di inizio della trascrizione. In Figura 5A sono schematizzate le regioni promotrici di questi due geni e sono indicate le sequenze ARE. Questi due costrutti sono stati successivamente trasfettati in maniera transiente nelle cellule NIH3T3 e nel clone NIH-DEM-12, cresciuto nel mezzo normale senza DEM per un mese. I risultati sono stati normalizzati per l'attività di luciferasi di Renilla (come descritto nei materiali e metodi). Dalla Figura 5A si evince che i promotori di questi due geni dirigono un'attività luciferasica che risulta significativamente più elevata nel clone NIH-DEM-12 rispetto a quella osservata nelle cellule NIH3T3.

Questi dati inoltre suggeriscono che i livelli di espressione elevati dei cloni sono regolati da meccanismi che agiscono a livello trascrizionale e che tali livelli di espressione potrebbero essere aumentati per la presenza o per la maggiore attività di un fattore trans-attivante che influenza la trascrizione dei promotori dei due geni endogeni e che è responsabile così dell'accumulo dei due mRNA nel clone resistente.

E' noto che il fattore trascrizionale Nrf2, interagisce con le sequenze ARE (89). Questa proteina è regolata dal fattore Keap1 che la tiene bloccata nel citoplasma e la dirige al proteasoma. In seguito all'esposizione delle cellule allo stress ossidativo, Nrf2 si stacca da Keap1 e si accumula nel nucleo dove attiva la trascrizione dei geni bersaglio (24).

Abbiamo quindi misurato i livelli di mRNA sia di Nrf2 che di Keap1 nelle cellule NIH3T3 che nel clone NIH-DEM-12, ma non abbiamo trovato alcuna differenza significativa.

Quindi abbiamo deciso mediante esperimenti di Western-Blot, di misurare la quantità della proteina Nrf2 presente negli estratti nucleari nel clone NIH-DEM-

12 confrontata con le cellule NIH3T3. Tali esperimenti sono stati condotti anche utilizzando estratti nucleari provenienti da cellule esposte alla concentrazione di 100 μ M di DEM, che si sa induce l'accumulo di Nrf2 nel nucleo (24). I risultati sono mostrati in Figura 5B: si evince che nel nucleo delle cellule resistenti, i livelli basali della proteina Nrf2 risultano più elevati di quella rilevata nelle cellule NIH3T3. Inoltre, nel clone NIH-DEM-12 l'accumulo di Nrf2 dopo esposizione al DEM è significativamente più elevato rispetto a quello osservato nelle cellule parentali nelle stesse condizioni. In queste stesse condizioni, i livelli della proteina Nrf1, un altro membro della famiglia di Nrf2, regolata diversamente da Nrf2, risultano comparabili nei nuclei delle due linee cellulari.

Questi dati ci hanno permesso di concludere che l'aumento della trascrizione dei geni GST α 1, e x-CT in condizioni basali nel clone resistente allo stress ossidativo è correlato a livelli nucleari più elevati della proteina Nrf2.

3.3 L'iperespressione di p53 interferisce con l'induzione mediata da Nrf2 dei promotori contenenti sequenze ARE

I risultati precedentemente descritti ci hanno indotto a studiare meglio i meccanismi molecolari della regolazione dei geni antiossidanti Nrf2-dipendenti. Come prima cosa abbiamo verificato l'attività del promotore del gene x-CT in diverse condizioni sperimentali: i) in seguito a trattamento delle cellule con 100 μ M di DEM; ii) in presenza di un vettore di espressione FLAG-Nrf2, che contiene il cDNA umano di Nrf2 clonato "in frame" con l'epitopo FLAG, già descritto nei materiali e metodi e iii) dopo co-trasfezione di FLAG-Nrf2 e successivo trattamento con DEM.

I risultati sono riportati in Figura 6A. Come atteso, nelle Hepa 1-6 l'attività luciferasica sotto il controllo del promotore del gene x-CT è attivata dallo stress ossidativo indotto dal DEM che agisce attraverso un meccanismo che prevede il reclutamento del fattore trascrizionale Nrf2. A riprova di ciò, la trasfezione transiente di FLAG-Nrf2 induce una attivazione del gene x-CT/Luc simile a quella osservata con il DEM. Paradossalmente, nelle cellule precedentemente co-trasfettate con FLAG-Nrf2 ed esposte al DEM, si osserva una significativa

riduzione dell'attività luciferasica Nrf2-dipendente. Questo dato era inatteso in quanto era ipotizzabile un effetto sinergico dell'induzione Nrf2-dipendente con quella DEM-dipendente.

Nella parte inferiore della Figura 6A, sono mostrati esperimenti di Western Blot, in cui sono stati misurati i livelli di espressione di FLAG-Nrf2 dopo trafezione, utilizzando un anticorpo specifico anti-FLAG, e i livelli delle proteine totali con un anticorpo anti-tubulina.

Abbiamo quindi ipotizzato che lo stress ossidativo potesse indurre altri effetti, diversi da quelli dipendenti da Nrf2. Un possibile effetto potrebbe essere correlato al danno al DNA indotto dallo stress ossidativo.

Inoltre, da un'analisi di sequenza del promotore del gene x-CT avevamo individuato due putativi siti di legame per il fattore trascrizionale p53. Quindi, nell'ipotesi che lo stress ossidativo potesse, attraverso un danno al DNA, indurre altri effetti, tra cui aumento dell'attività di p53, abbiamo trasfettato x-CT/Luc in cellule che mancano di p53. Questo esperimento è stato condotto nelle cellule Calu-6 e Saos-2 in cui p53 è assente oppure inattivo (156, 158). I risultati di questi esperimenti, riportati nella Figura 6A, mostrano chiaramente che lo stress ossidativo indotto dal DEM in queste cellule non ha effetti sull'induzione dell'espressione del gene x-CT da parte di Nrf2, suggerendo quindi il coinvolgimento di p53 nella regolazione del gene x-CT.

Allo scopo di dimostrare ulteriormente un potenziale ruolo di p53 nell'espressione di questo gene, abbiamo trasfettato il costrutto x-Ct /Luc nelle suddette linee cellulari in assenza ed in presenza di quantità crescenti di p53.

I risultati di questi esperimenti sono riportati nella Figura 6B. Come mostrato, la cotrasfezione di x-CT/Luc e di FLAG-Nrf2 in presenza di p53, comporta un effetto inibitorio sull'attivazione Nrf2-dipendente di tale gene e tale effetto è dose-dipendente. Dalla Figura 6B si evince anche che questo fenomeno è drastico nelle cellule Calu-6 e Saos-2 che mancano di p53, infatti in queste cellule la trasfezione di piccole quantità 0,125 µg del vettore di p53 abolisce completamente la trascrizione di x-CT/Luc.

Per controllare i livelli di espressione di FLAG-Nrf2 e di p53, con gli stessi estratti delle cellule trasfettate, sono stati effettuati esperimenti di Western blot utilizzando anticorpi specifici come mostrato nella parte bassa della Figura 6B.

Abbiamo deciso quindi di esplorare i possibili effetti di p53 sull'espressione di altri geni correlati allo stress ossidativo, quali i geni GST α 1 e NQO1 (159, 160), che contengono sequenze ARE nella loro regione promotrice. Abbiamo perciò clonato i promotori di tali geni (GST α 1-Luc e NQO1-Luc) a monte del gene "reporter" della luciferasi ed abbiamo analizzato i livelli di espressione nelle cellule Hepa 1-6 e Calu-6 in presenza di FLAG-Nrf2; FLAG-Nrf2 e DEM; e FLAG-Nrf2 e p53. I risultati ottenuti da questi esperimenti confermano completamente quanto riportato in precedenza con il costrutto x-CT/Luc (Figura 7 A e B) nelle cellule Hepa 1-6 e Calu-6.

3.4 Il danno al DNA attiva p53 che contrasta l'attività di geni Nrf2-dipendenti

I dati prima presentati suggerivano che p53 esercita un effetto di natura inibitoria sull'attività trascrizionale dei geni Nrf2-dipendenti.

Per valutare gli effetti di Nrf2 e p53 sulla trascrizione dei geni endogeni di x-CT e NQO1, abbiamo trasfettato cellule HEK 293 con il costrutto FLAG-Nrf2 in presenza e in assenza di un vettore di espressione per p53 ed abbiamo analizzato i livelli di mRNA dei geni endogeni x-CT e NQO1. Queste cellule sono state scelte perché il metodo di trasfezione della lipofectamina nelle nostre condizioni sperimentali, ci permetteva di ottenere un'elevata efficienza di trasfezione (maggiore del 50 %). Le cellule sono state raccolte dopo 48 ore dalla trasfezione e gli mRNA sono stati misurati mediante la tecnica della PCR Real Time. Come mostrato nell'istogramma della Figura 8, l'iperespressione di Nrf2 induce aumento dei livelli di mRNA di x-CT e NQO1 di circa tre volte e la coespressione di p53 abolisce quasi completamente gli effetti di Nrf2 sui livelli di messaggero endogeno. Come controllo abbiamo misurato i livelli di mRNA di GADD45 che è noto essere indotto, a livello trascrizionale da p53, e come ci aspettavamo, questi livelli non sono influenzati da Nrf2 mentre p53 induce un'accumulo significativo dell'mRNA di GADD45. Nel riquadro in alto, nella stessa Figura sono mostrati i livelli di espressione di FLAG-Nrf2 e p53.

3.5 Il danno al DNA si contrappone alla risposta antiossidante mediata da Nrf2 attraverso un meccanismo p53 dipendente.

I risultati riportati precedentemente possono essere spiegati ipotizzando che un accumulo di ROS, indotto da trattamento con il DEM, provoca l'attivazione di p53 probabilmente in seguito a danno al DNA.

Quindi, ci siamo chiesti se l'attivazione di p53 endogeno indotto attraverso un danno al DNA non dovuto a stress ossidativo, avesse lo stesso effetto dell'iperespressione di p53 ottenuta attraverso trasfezione transiente. A questo scopo le cellule Hepa 1-6 sono state trasfettate con x-CT/Luc in presenza e in assenza del vettore di espressione FLAG-Nrf2. Dopo trasfezione le cellule sono state trattate con 100 μ M di etoposide o 10 μ M di cisplatino per 12 e 24 ore per indurre danno al DNA. I valori dell'attività luciferasica ottenuti in queste condizioni sono mostrati nella Figura 9A. I risultati dimostrano che l'attivazione di p53 nelle cellule Hepa 1-6, ottenuta in seguito ai trattamenti sia con l'etoposide che con il cisplatino, determina una significativa diminuzione dell'attivazione del promotore del gene x-CT indotto da Nrf2. Il danno al DNA è stato da noi messo in evidenza attraverso l'analisi dei livelli della proteina ATM fosforilata (pATM), che viene indotta in seguito al danno al DNA e attiva p53 (pannelli inferiori della Figura 9A).

Il fatto che questo fenomeno sia dipendente da una attivazione di p53 è dimostrato inequivocabilmente dall'osservazione che nelle cellule Calu-6 che mancano di p53 l'inibizione del gene x-CT, dipendente dal danno al DNA è completamente assente (Figura 9B).

Risultati simili che non vengono riportati in questa tesi, sono stati ottenuti utilizzando i costrutti luciferasi di GST α 1 e NQO1.

Questi risultati nel loro insieme hanno suggerito una risposta articolata delle cellule ai ROS: l'attivazione di p53 si contrappone al sistema di induzione Nrf2-dipendente dei geni antiossidanti.

Per avere risultati non influenzati dall'iperespressione di FLAG-Nrf2, abbiamo deciso di trattare le cellule Hepa 1-6 con etoposide per indurre l'attivazione di p53 endogeno e di esporre queste stesse cellule al trattamento con 100 μ M di DEM per un'ora per indurre la risposta antiossidante mediata da Nrf2 endogeno e di analizzare i livelli endogeni degli mRNA dei geni x-CT e NQO1.

Questi esperimenti sono stati condotti in parallelo con trasfezione transiente per analizzare l'attività luciferasica nelle condizioni suddette (Figura 10 A, pannello di sinistra). In queste cellule la trascrizione del gene reporter x-CT/Luc è attivata dal DEM e i trattamenti con etoposide non hanno effetto sull'attività luciferasica. Al contrario l'attivazione della trascrizione indotta dal DEM è significativamente diminuita in cellule precedentemente esposte all'etoposide. La risposta del gene x-CT endogeno, analizzata nelle stesse condizioni sperimentali mediante PCR Real Time, ha dimostrato che gli mRNA sia di x-CT che di NQO1 vengono indotti dal trattamento con il DEM ma i pre-trattamenti con etoposide sopprimono significativamente la risposta al DEM di tali geni. Come controllo dei trattamenti abbiamo misurato i livelli di mRNA di GADD45 (Figura 10 A) e i livelli della proteina p53 mediante Western Blot (Figura 10 C).

Lo stesso esperimento condotto nelle cellule Calu-6 mostra che l'etoposide in assenza di p53, non ha effetto sia sulla trascrizione del costrutto "reporter" che sui livelli endogeni di mRNA di x-CT (Figura 10 B).

Inoltre in queste condizioni il DEM sia nelle Hepa 1-6 che nelle Calu-6 induce un significativo accumulo di Nrf2 nel nucleo come dimostrato attraverso Western Blot, mentre non ha nessun effetto sui livelli della proteina Nrf1, un altro membro della famiglia di Nrf2 (Figura 10 D).

Per confermare che tutte le risposte biologiche osservate fino ad ora nelle cellule Hepa1-6 e Calu-6 dipendessero solo da p53 e non da un contesto cellulare differente, abbiamo ripetuto questi stessi esperimenti in due linee cellulari isogeniche, le HCT116. Queste cellule derivano da carcinoma umano di colon e sono due linee cellulari con genoma identico, eccetto che una (HCT116 +/+) contiene p53 normale e funzionante, l'altra manca di p53 in quanto il locus TP 53 è stato inattivato per ricombinazione somatica (HCT116 -/-) (28).

Le cellule HCT116 +/+ e HCT116 -/- sono state trasfettate con x-CT/Luc in presenza e in assenza del vettore di espressione FLAG-Nrf2 e dopo trasfezione esse sono state trattate con 200 μ M di etoposide o 20 μ M di cisplatino per 12 e 24 ore per indurre un danno al DNA. I valori dell'attività luciferasica ottenuti in queste condizioni sono mostrati nella Figura 11A. L'analisi mediante Western

Blot dei livelli della proteina p53 negli estratti cellulari, rivela attivazione di p53 nelle cellule HCT116 +/+ trattate sia con etoposide che con il cisplatino. I risultati dimostrano che p53 determina una significativa diminuzione dell'attivazione del promotore Nrf2-dipendente del gene x-CT in queste cellule e non nella linea isogenica HCT116 -/-.

Infine, abbiamo verificato se il livello dell'mRNA di x-CT endogeno indotto in maniera Nrf2-dipendente, veniva represso in presenza di p53 endogeno attivato in seguito a danno al DNA. A tale scopo, abbiamo trattato le cellule HCT116 +/+, dapprima con cisplatino per 24 ore per indurre danno al DNA e poi con DEM per indurre la risposta antiossidante Nrf2-dipendente. L'analisi per PCR Real Time del messaggero del gene x-CT ha dimostrato che i livelli di mRNA vengono indotti dal DEM come atteso e che tale aumento è inibito dal pre-trattamento delle cellule con cisplatino (Figura 11 B). Tale esperimento è stato condotto in parallelo con trasfezione transiente di x-CT/Luc per analizzare anche l'attività luciferasica nelle condizioni suddette (Figura 11 B pannello di sinistra). L'attivazione di p53 e di Nrf2 è stata valutata mediante esperimenti di Western Blot (Figura 11 D e E). Lo stesso esperimento effettuato nelle cellule HCT116 -/- mostra che il cisplatino, in assenza di p53, non ha alcun effetto sull'induzione Nrf2-dipendente del gene x-CT.

4. DISCUSSIONE E PROSPETTIVE FUTURE

Numerosi dati provenienti da diversi laboratori hanno indicato che la resistenza cellulare allo stress ossidativo è correlata ad un particolare fenotipo molecolare: espressione elevata di enzimi antiossidanti e di sistemi di riparo del DNA, così come ad apoptosi ridotta ed attivazione di geni che inducono arresto del ciclo cellulare. Tale programma si realizza mediante attivazione o repressione di numerosi geni bersaglio, con modificazione significativa del profilo di espressione genica. Alcune proteine tra cui Nrf2 e p53 sembrano avere un ruolo determinante nella comparsa del fenotipo resistente allo stress ossidativo. Tuttavia i meccanismi molecolari che sono implicati in tale processo non sono ancora ben compresi.

L'interesse suscitato da questi studi è notevole in quanto la resistenza allo stress ossidativo è stata correlata all'invecchiamento, al cancro e alla resistenza alla chemioterapia.

I risultati presentati in questa tesi dimostrano che la selezione di cloni cellulari resistenti allo stress ossidativo indotto dalla deplezione del glutathione è associata ad una modificazione significativa del profilo dell'espressione genica. Abbiamo dimostrato che in tutti i cloni analizzati i livelli basali della glutathione S-trasferasi $\alpha 1$ (GST $\alpha 1$) sono elevati. Questa osservazione suggerisce che GST $\alpha 1$ gioca un ruolo essenziale nella difesa antiossidante nei confronti del DEM. Inoltre anche gli mRNA di altri due geni, il trasportatore cistina/glutammato (x-CT) e la NAD(P)H: chinone ossido reduttasi (NQO1) risultano aumentati costitutivamente in quasi tutti i cloni.

Per chiarire i meccanismi molecolari che sono alla base di questo accumulo di mRNA, abbiamo analizzato i livelli della trascrizione della regione promotrice di questi geni, clonata a monte del cDNA "reporter" della luciferasi, nelle cellule resistenti. I risultati dimostrano che l'aumento dei livelli di mRNA di Gst $\alpha 1$ e x-CT sono dovuti ad un incremento della trascrizione. Inoltre, l'analisi dei livelli nucleari del fattore trascrizionale Nrf2 ha dimostrato che tale aumento è correlato a livelli più alti di Nrf2. E' noto infatti che il promotore di tali geni contiene Antioxidant Response Elements (AREs), che sono i siti di legame per Nrf2.

La cellula risponde all'accumulo dei ROS attivando da un lato la risposta antiossidante Nrf2-dipendente basata su attivazione di geni che codificano per enzimi con attività "scavenger" e dall'altro un blocco transitorio del ciclo cellulare per permettere il riparo dei danni al DNA. Se il danno dovuto allo stress è eccessivo e la cellula non può riparare, viene attivato un programma di apoptosi. È noto che p53 è il maggior regolatore di questo processo.

I dati presentati in questa tesi dimostrano per la prima volta che questi due meccanismi di regolazione sono integrati e comunicanti tra loro. Infatti, l'attivazione di p53 comporta una repressione dell'induzione Nrf2-dipendente dei geni antiossidanti regolati dalle sequenze ARE. In particolare noi abbiamo analizzato la risposta a p53 dei geni x-CT, GST α 1 e NQO1 ed i risultati dimostrano che essi vengono soppressi quando p53 è iperespresso o attivato da danno al DNA.

Il coinvolgimento di p53 nella regolazione dell'omeostasi cellulare è stato suggerito da numerosi studi che hanno dimostrato che p53 può avere sia funzioni ossidanti che antiossidanti. In particolare esso attiva la trascrizione di geni i cui prodotti sono coinvolti nelle difese antiossidanti ma anche di geni con funzione pro-ossidante. Inoltre, bassi livelli di p53 sembrano associati all'attivazione di alcuni geni anti-ossidanti, e ciò comporta un decremento dei livelli di ROS intracellulari. Al contrario, un'attivazione di p53 dipendente da danno al DNA è correlato ad un aumento dei ROS, che hanno un ruolo determinante nell'induzione dell'apoptosi indotta da p53.

Tuttavia, i meccanismi molecolari con cui p53 può inibire l'espressione dei geni antiossidanti Nrf2-dipendenti restano da essere chiariti.

Una possibilità è che p53 interferisca direttamente o indirettamente con l'espressione delle proteine che regolano il sistema Nrf2/Keap1. Nostri dati preliminari non riportati in questa tesi, sui livelli di mRNA dei geni delle proteine Nrf2, Keap1 e Bach1 dimostrano che essi non sono modificati in condizioni di iperespressione o attivazione di p53.

Pertanto si può ipotizzare che p53 agisca da repressore diretto della trascrizione dei geni ARE-dipendenti.

I meccanismi di repressione mediati da p53, come discusso nell'Introduzione, sono numerosi e complessi. Oltre ad un legame diretto di p53 con il DNA, possono essere coinvolti altri meccanismi che includono interazione con altre

proteine, con i fattori basali della trascrizione, con proteine che modificano la cromatina, nonché legame di p53 a elementi di sequenza che differiscono notevolmente dalla sequenza di attivazione canonica di p53.

I nostri dati, oltre a confermare un ruolo di p53 nel controllo dell'omeostasi redox cellulare, dimostrano una fitta rete di comunicazione tra i sistemi di regolazione anti-ossidanti e quelli pro-ossidanti. Nell'ambito di un sistema cellulare danneggiato, p53 attivo previene l'induzione dei geni Nrf2-dipendenti che con il loro ruolo antiossidante potrebbero prevenire l'induzione dell'apoptosi, che richiede invece un sostanziale accumulo di ROS.

In questo modo, p53 opera un controllo su tale via e previene le possibili conseguenze di una attività persistente della risposta antiossidante. Un'ipotesi affascinante infatti che scaturisce da questo lavoro è che una deregolazione del sistema antiossidante Nrf2/Keap1 possa avere un ruolo determinante nella tumorigenesi.

I risultati presentati in questa tesi sono stati oggetto di pubblicazioni e/o di presentazioni a congressi, come di seguito indicato

Comunicazioni a congressi nazionali e internazionali:

Faraonio R., Di Marzo D., Vergara P., Cimino F. “Meccanismi di regolazione associati al fenotipo resistente all’apoptosi indotta dallo stress ossidativo”

Giornate scientifiche del polo delle scienze e delle tecnologie per la vita. (2004)

Faraonio R., Vergara P., Di Marzo D., Cimino F. “Meccanismi di regolazione trascrizionale di geni associati alla resistenza allo stress ossidativo”

Giornate scientifiche del polo delle scienze e delle tecnologie per la vita. (2005)

Vergara P., Di Marzo D., Faraonio R., Cimino F. “Ruolo dei fattori trascrizionali Nrf2 e p53 nella risposta cellulare allo stress ossidativo”

Giornate scientifiche del polo delle scienze e delle tecnologie per la vita. (2006)

Pubblicazioni su riviste scientifiche nazionali e internazionali

Faraonio R., Vergara P., Di Marzo D., Napolitano M., Russo T., Cimino F.

Transcription regulation in NIH3T3 cell clones resistant to diethylmaleate-induced oxidative stress and apoptosis. 2006 Antioxid Redox Signal Mar-Apr;8(3-4):365-74.

Faraonio R., Vergara P., Di Marzo D., Pierantoni G.M., Russo T., Cimino F. “Involvement of p53 in the regulation of Nrf2-dependent transcription of antioxidant response genes”

The Italian Journal of Biochemistry (SIB) 2006

Faraonio R, Vergara P, Di Marzo D, Pierantoni MG, Napolitano M, Russo T, Cimino F p53 suppresses the Nrf2-dependent transcription of antioxidant response genes. J Biol Chem. 2006 Oct 31; [Epub ahead of print]

5 BIBLIOGRAFIA

- 1 Halliwell B, and Whiteman M. (2004) *Br J Pharmacol.* **42** 231-55.
- 2 Dawson, V. L. and Dawson, T. M. (1996) *Cell Death Differ* **3** 71-78
- 3 M. Valko, et al. (2006) *Chemico-Biological Interactions* **160** 1–40
- 4 Balaban RS et al. (2005) *Cell.* **120** 483-95
- 5 Lambeth JD. (2004) *Nat Rev Immunol.* **4** 181-9.
- 6 Sumimoto H, et al. 2005 *Biochem Biophys Res Commun.* **338** 677-86.
- 7 Bondy SC, and Naderi S. (1994). *Biochem Pharmacol.* **48** 155-9
- 8 van der Zand A, et al. (2006) *J Cell Sci.* **119** 989-94.
- 9 Finkel T. and Holbrook N.J. (2000) *Nature* **408** 239-47
- 10 Halliwell B. (2006) *J Neurochem.* **97** 1634-58.
- 11 Finkel T. (2005) *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6** 971-6.
- 12 Droge W. (2002) *Physiol Rev* **82** 47-95
- 13 Finkel T. (2003) *Curr Opin Cell Biol.* **15** 247-54.
- 14 Esposito F., et al. (2004) *Neurochem Res.* **29** 617-28.
- 15 Stamler JS, et al. (1992) *Science* **258** 1898-902.
- 16 Sundaresan M, et al. (1995) *Science* **270** 296-9.
- 17 Kolch W. (2000) *J. Biol. Chem* **351** 389-305
- 18 Meng TC, et al. (2002) *Mol Cell.* **9** 387-99.
- 19 Blanchetot C, et al. (2002) *EMBO J.* **21** 493-503.
- 20 Cimino, F., et al. (1997) *Curr. Top. Cell. Regul.* **35**: 123-148.
- 21 Marshall HE, et al. (2000) *FASEB J.* **13** 1889-900
- 22 Abate, C., et al. (1990) *Science* **249**: 1157-1161.
- 23 Kobayashi M, and Yamamoto M 2005 *Antioxid Redox Signal* **7** 385-94
- 24 Itoh K, et al. (1999) *Genes Dev* **13**: 76-86
- 25 Jaiswal AK. (2004) *Methods Enzymol.* **378** 221-38.
- 26 Dinkova-Kostova AT, et al. 2002 *Proc Natl Acad Sci USA* **99** 11908-13
- 27 Hainaut, P., and Milner J. (1993) *Cancer Res.* **53**: 4469-4473
- 28 Hollstein, M., et al. (1991) *Science* **253**: 49-53
- 29 Semenza GL.(2000) *J Appl Physiol.* **88** 1474-80.
- 30 Wang GL, et al. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92** 5510-4.
- 31 Harman, D. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **78** 7124-7128.
- 32 Stadtman, E.R. (1992) *Science.* **257** 1220-1224.
- 33 Beckman, K.B., and Ames, B.N. (1998) *Physiol Rev.* **178** 547-581.
- 34 Longo, V.D., and Finch C. E. (2003) *Science* **299** 1342-1346.
- 35 Campisi J. (2005) *Cell.* **120** 513-22.
- 36 Ko LJ, and Prives C. (1996) *Genes Dev.* **10** 1054-72.
- 37 Lee AC, et al. (1999) *J Biol Chem.* **274** 7936-40.
- 38 Faraonio R, et al. (2002) *Cell Death Differ.* **9** 862-4.
- 39 Simon HU, et al. (2000) *Apoptosis* **5** 415-8,.
- 40 Davis W Jr, et al (2001) *J Pharmacol Exp Ther.* **296** 1-6
- 41 Wang X. (2001) *Genes Dev.* **22** 2922-33.
- 42 Green DR. (2000) *Cell.* **102** 1-4.
- 43 Danial NN, and Korsmeyer SJ. (2004) *Cell.* **116** 205-19.
- 44 Verheij M, et al. (1669) *Nature.* **380** 75-9.
- 45 Chipuk JE, et al. (2004) *Science.* Feb **303** 1010-4.
- 46 Moll UM, et al. (2005) *Curr Opin Cell Biol.* **17** 631-6.
- 47 Larrick JW, and Wright SC. (1990) *FASEB J.* **4** 3215-23.
- 48 Clement MV, and Stamenkovic I. (1996) *EMBO J.* **15** 216-25.

49 Johnstone RW, et al. (2002) Cell. Jan **108** 153-64.
 50 Datta SR, et al. (1999) Genes Dev. **13** 2905-27.
 51 Baldwin AS. (2001) J Clin Invest. **107** 241-6.
 52 Storz P. (2005) Front Biosci. **10** 1881-96.
 53 Szatrowski TP, and Nathan CF. (1991) Cancer Res. **51** 794-8.
 54 McCord JM, and Fridovich I. (1969) J Biol Chem. **244** 6049-55.
 55 Radi R, et al. (1991) J Biol Chem. **266** 22028-34.
 56 Cohen G, and Hochstein P. (1963) Biochemistry. **2** 1420-8.
 57 Holmgren A. (1995) Structure. **3** 239-43.
 58 Sasada T, et al. (1996) J Clin Invest. **97** 2268-2276.
 59 Chang TS, et al. (2004) J Biol Chem. **279** 41975-84.
 60 Dickinson DA, and Forman HJ. 2002 Biochem Pharmacol. **64** 1019-26.
 61 Hekimi S, and Guarente L. (2003) Science. **299** 1351-4.
 62 Accili D, and Arden KC. (2004) Cell. **117** 421-6.
 63 Murphy CT, et al. (2003) Nature. **424** 277-83.
 64 Longo VD, and Fabrizio P. (2002) Cell Mol Life Sci. **59** 903-8.
 65 Migliaccio, E., et al. (1999) Nature **402** 309-313
 66 Nemoto S, and Finkel T. (2002) Science. **295** 2450-2.
 67 Giorgio M, et al. (2005) Cell. **122** 221-33.
 68 North BJ, and Verdin E.(2004) Genome Biol. **5** 224.
 69 Mostoslavsky R, et al. (2006) Cell. **124** 315-29.
 70 Brunet A, et al. (2004) Science. **303** 2011-5.
 71 Guarente L, and Picard F. (2005) Cell. **120** 473-82.
 72 Vaziri H, et al. (2001) Cell. **107** 149-59.
 73 Luo J, et al. (2001) Cell. **107** 137-48.
 74 Hofseth LJ, et al. (2004) Trends Pharmacol Sci. **25** 177-81
 75 Polyak K, et al. (1997) Nature. **389** 300-5.
 76 Sablina AA, et al. (2005) Nat Med. **11** 1306-13.
 77 Renschler MF. (2004) Eur J Cancer. **40** 1934-40.
 78 Pervaiz S, and Clement MV. (2004) Curr Pharm Des. **10** 1969-77.
 79 Itoh K, et al. (1995) Mol Cell Biol. **15** 4184-93.
 80 Ishii T, et al. (2000) J Biol Chem. **275** 16023-9.
 81 Kim YC, et al. (2001) J Biol Chem. **276** 18399-406
 82 Kwak M. K., et al. (2004) Mutat. Res. **555** 133-148
 83 Pietsch EC, et al. (2003) J Biol Chem. **278** 2361-9
 84 Kim YC, et al. (2003) Oncogene. **22** 1860-5.
 85 Sekhar K. R., et al. 2000 Biochem Biophys Res Commun **270** 311-317
 86 Sasaki H, et al. (2002) J Biol Chem **277** 44765-71
 87 Holtzclaw WD, et al. (2004) Adv Enzyme Regul. **44** 335-67.
 88 Sheehan D, et al. (2001) Biochem J. **360** 1-16.
 89 Motohashi H, et al. (2004) Proc Natl Acad Sci U S A. **101** 6379-84.
 90 Kobayashi, A., et al. (2004) Methods Enzymol. **378** 273-286.
 91 Motohashi, H., and M. Yamamoto 2004 Trends Mol. Med. **10**:549-557
 92 Venugopal R, and Jaiswal AK. (1998) Oncogene. **17** 3145-56.
 93 He CH, et al. (2001) J Biol Chem. **276** 20858-65.
 94 Sun J, et al. (2002) EMBO J. **21** 5216-24.
 95 Kang, M.-I., et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101**:2046-2051
 96 Zhang D. D., et al. (2004) Mol. Cell. Biol. **24**:10941-10953.
 97 Kobayashi A., et al. (2006) Mol and Cel Biol **26**. 221-229
 98 Hayashi A, et al. (2003) Biochem Biophys Res Commun. **310** 824-9.

- 99 Ishii T, et al. (2004) *Circ Res.* **94** 609-16.
- 100 Kwak MK, et al. (2002) *Mol Cell Biol.* **22** 2883-92.
- 101 Kwak MK, et al. (2003) *Mol Cell Biol.* **23** 8786-94.
- 102 Kwak MK, et al. (2003) *J Biol Chem.* **278** 8135-45.
- 103 Braithwaite AW, et al. (2006) *Cell Death Differ.* **13** 984-93.
- 104 Vogelstein B, et al. (1989) *Science.* **244** 207-11.
- 105 Levine, A. J. (1997) *Cell* **88**:323-331
- 106 Vogelstein B, et al. (2000) *Nature.* **408** 307-10.
- 107 Wahl GM, and Carr AM. (2001) *Nat Cell Biol.* **3** E277-86.
- 108 Zhao R, et al. (2000) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **65** 475-482
- 109 Kussie PH, et al. (1996) *Science.* **274** 948-53.
- 110 Wahl GM. (2006) *Cell Death Differ.* **13** 973-83.
- 111 Canman CE, et al. (1998) *Science.* **281** 1677-9.
- 112 Banin S, et al. (1998) *Science.* **281** 1674-7.
- 113 Abraham J, et al. (2000) *J Mol Biol.* **295** 853-64.
- 114 Sakaguchi K, et al. (1998) *Genes Dev.* **12** 2831-41.
- 115 Johnson TM, and Attardi LD. (2006) *Cell Death Differ.* **13** 902-8.
- 116 Harper JW, et al. (1993) *Cell.* **75** 805-16.
- 117 Kastan MB, et al. (1992) *Cell.* **71** 587-97.
- 118 Mackintosh C.(2004) *Biochem J.* **381** 329-42.
- 119 Chipuk JE, and Green DR.(2006) *Cell Death Differ.* **13** 994-1002.
- 120 Polyak K, et al. (1997) *Nature.* **389** 300-5.
- 121 Tan M, et al. (1999) *J Biol Chem.* **274** 12061-6.
- 122 Gatz SA, and Wiesmuller L. (2006) *Cell Death Differ.* **13** 1003-16.
- 123 Budanov AV, et al. (2002) *Oncogene.* **21** 6017-31.
- 124 Velasco-Miguel S, et al. (1999) *Oncogene.* **18** 127-37.
- 125 el-Deiry WS, et al. (1992) *Nat Genet.* **1** 45-9.
- 126 Harms KL, and Chen X. (2006) *Cell Death Differ.* **13** 890-7.
- 127 Hill DA, et al. (2004) *J Cell Biochem.* **91** 987-98.
- 128 An W, et al. (2004) *Cell.* **117** 735-48.
- 129 Zhang X, et al. (2005) *Mol Cell.* **19** 89-100.
- 130 Burns TF, and El-Deiry WS. (2003) *Cancer Biol Ther.* **2** 431-43.
- 131 Ho J, and Benchimol S. (2003) *Cell Death Differ.* **10** 404-8.
- 132 Laptenko O, and Prives C. (2006) *Cell Death Differ.* **13** 951-61.
- 133 Zhu N, et al. (2005) *Biochem Biophys Res Commun.* **335** 1272-9.
- 134 Liu G, et al. (1999) *Biochem Biophys Res Commun.* **264** 359-64.
- 135 Lee KC, et al. (1999) *Mol Cell Biol.* **19** 1279-88.
- 136 St Clair S, et al. (2004) *Mol Cell.* **16** 725-36.
- 137 Subbaramaiah K, et al. (1999) *J Biol Chem.* **274** 10911-5.
- 138 Murphy M, et al. (1999) *Genes Dev.* **13** 2490-501.
- 139 Johnson RA, et al. (2005) *J Biol Chem.* **280** 13213-9.
- 140 Sengupta S, et al. (2005) *Oncogene.* **24** 1738-48.
- 141 Chun AC, and Jin DY. (2003) *J Biol Chem.* **278** 37439-50.
- 142 Wilkinson DS, et al. (2005) *Mol Cell Biol.* **25** 1200-12
- 143 Rocha S, et al. (2003) *Mol Cell Biol.* **23** 4713-27.
- 144 Lohr K, et al. (2003) *J Biol Chem.* **278** 32507-16.
- 145 Venot C, et al. (1998) *EMBO J.* **17** 4668-79.
- 146 Kim E, et al. (2003) *Oncogene.* **22** 7716-27.
- 147 Gridasova AA, and Henry RW. (2005) *Mol Cell Biol.* **25** 3247-60.
- 148 Johnson RA, et al. (2001) *J Biol Chem.* **276** 27716-20.

149 Zhai W, and Comai L. (2000) Mol Cell Biol. **20** 5930-8.
 150 Crichton D, et al. (2003) EMBO J. **22** 2810-20.
 151 Eichhorn K, and Jackson SP. (2001) J Biol Chem. **276** 21158-65.
 152 Cairns CA, and White RJ.(1998) EMBO J. **17** 3112-23.
 153 Esposito F. et al (2002) Methods Enzymol. 352 258-268
 154 Faraonio R., et al. (2006) Antioxid Redox Signal. **8**, 365-374
 155 Livak KJ, and Schmittgen TD. (2001) Methods. **25** 402-8.
 156 Diller L. et al. (1990) Mol Cell. Biol. **10** 5772-81
 157 Adler V, et al. (1999) EMBO J. **18** 1321-34
 158 Caamano J., et al (1991) Am. J. Pathol **139** 839-45
 159 Friling R.S., et al (1990) Prot. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **87** 6258-62
 160 Venugopal R. and Jaiswal A. K. 1996 Prot Natl Acad Sci USA **93**

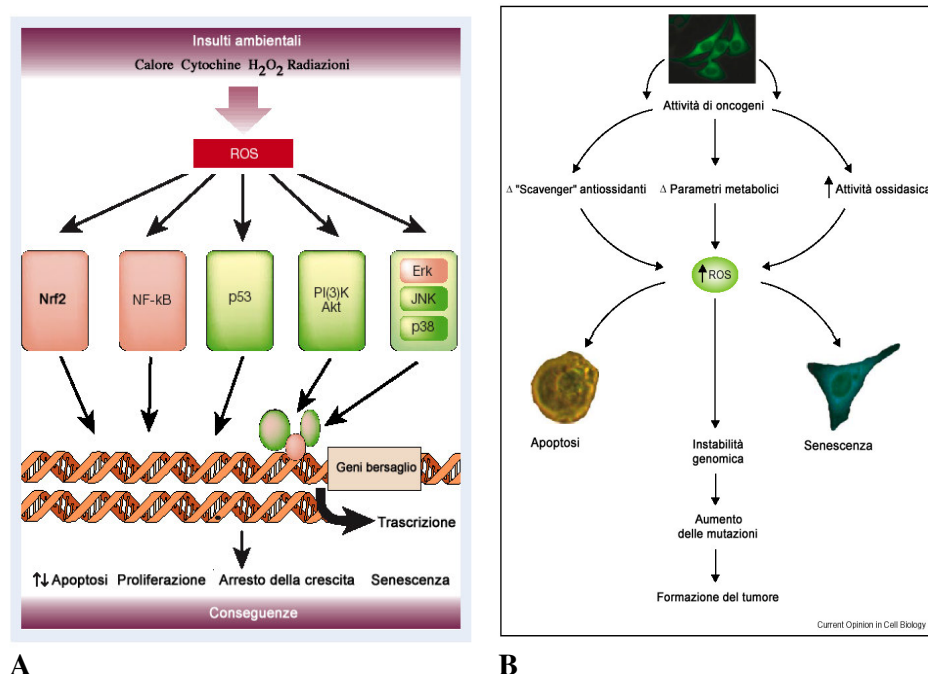


Figura 1

A. Le cascate del segnale più importanti attivate in risposta allo stress ossidativo.

I ROS possono essere prodotti all'esterno della cellula, o dalla cellula stessa in risposta a stimoli esterni. I fattori di trascrizione Nrf2, p53 e NF-κB sono essi stessi regolati dai ROS, mentre le vie del segnale PI(3)K/Akt e MAPK regolano fattori di trascrizione attraverso la fosforilazione.

Il risultato definitivo dipende dal bilancio tra le varie cascate stress-dipendenti.

B. Un modello per lo stress ossidativo nella formazione del tumore.

L'attivazione di alcuni oncogeni (per esempio c-ras) determina un aumento dei ROS intracellulari attraverso alterazioni dello "scavenging", del metabolismo e di ossidasi cellulari. L'eliminazione delle cellule mutate avviene con senescenza prematura o apoptosi. Alcune cellule possono "sfuggire" a questo controllo, e la continua esposizione agli ossidanti innesca instabilità genomica, mutazioni e infine tumore.

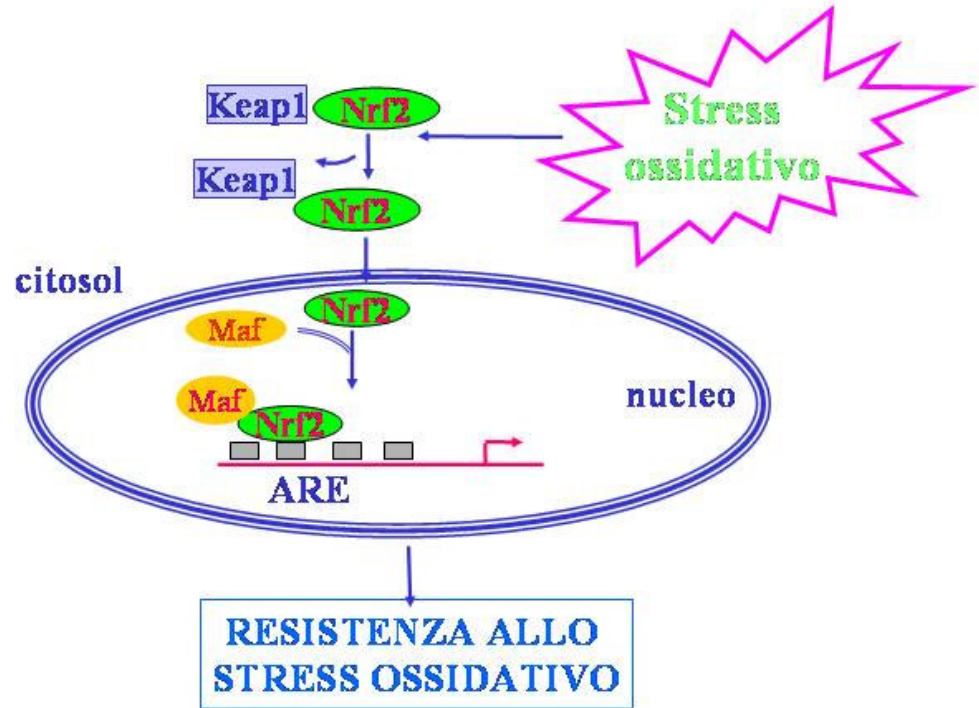
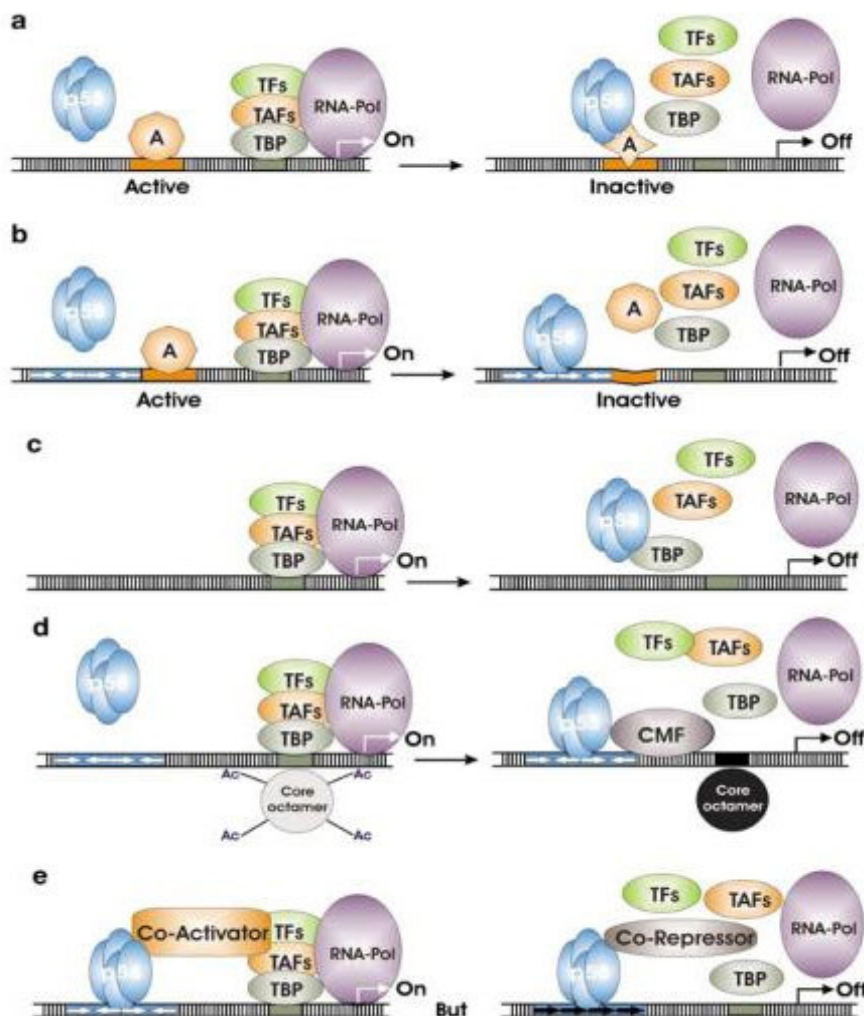


Figura 2 **Meccanismo di regolazione di Nrf2.**

La proteina Nrf2, in condizioni basali è localizzata nel citoplasma, legata alla proteina del citoscheletro cellulare Keap1. In seguito a stress ossidativo Nrf2 si stacca da Keap1, migra nel nucleo dove svolge la sua funzione di attivatore trascrizionale di geni implicati nella resistenza allo stress ossidativo. Nrf2 per essere attivo come fattore trascrizionale deve eterodimerizzare con le piccole proteine della famiglia Maf.



Adattata da Laptenko O, and Prives C. (2006) Cell Death Differ. 13 951-61.

Figura 3 Meccanismi di repressione trascrizionale di p53

Sono mostrati differenti meccanismi di repressione p53-dipendente.

(a) p53 reprime la trascrizione attraverso modificazione conformazionale di uno specifico attivatore *via* interazione proteina-proteina. In questo contesto p53 non lega direttamente il DNA.

(b) p53 blocca la trascrizione in seguito a legame con il DNA che determina un distacco della macchina trascrizionale.

(c) la repressione p53-dipendente è determinata dall'interazione della proteina p53 con fattori basali della macchina trascrizionale.

(d) p53 reprime la trascrizione attraverso il reclutamento di fattori che modificano la cromatina con conseguente modificazione del core istonico e chiusura del promotore

(e) l'inibizione trascrizionale avviene in seguito al legame di p53 a nuovi elementi di sequenza (mostrati con un colore diverso) che comporta una architettura della macchina trascrizionale con funzione repressoria.

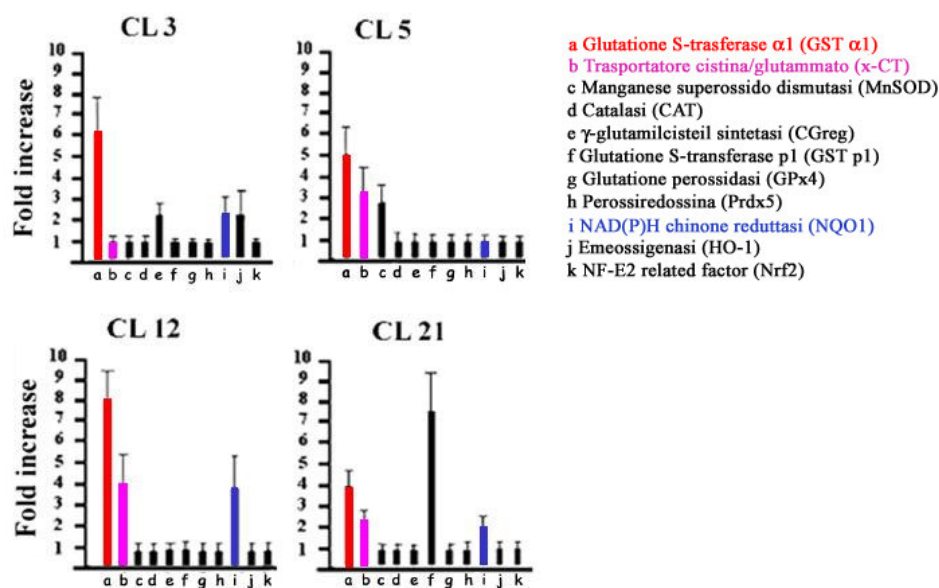


Figura 4 **Profilo dell'espressione genica dei cloni resistenti allo stress ossidativo indotto dal DEM.**

I livelli di mRNA sono stati analizzati mediante PCR Real Time, in cloni resistenti allo stress ossidativo cresciuti per un mese in assenza di DEM. I valori riportati nell'istogramma sono stati ottenuti confrontando i livelli relativi di mRNA di ciascun gene delle cellule resistenti con quelli delle cellule NIH3T3. Per la quantizzazione è stato usato il metodo dell'analisi comparativa (metodo del $\Delta\Delta C_t$), utilizzando come gene di riferimento c-ABL, il cui trascritto non varia nelle nostre condizioni sperimentali.

In alto è mostrato l'elenco dei geni da noi analizzati.

Gli istogrammi in colore mostrano i livelli dei geni GST $\alpha 1$, x-CT, NQO1 che sono iperespressi, anche se in maniera diversa, in quasi tutti i cloni resistenti analizzati.

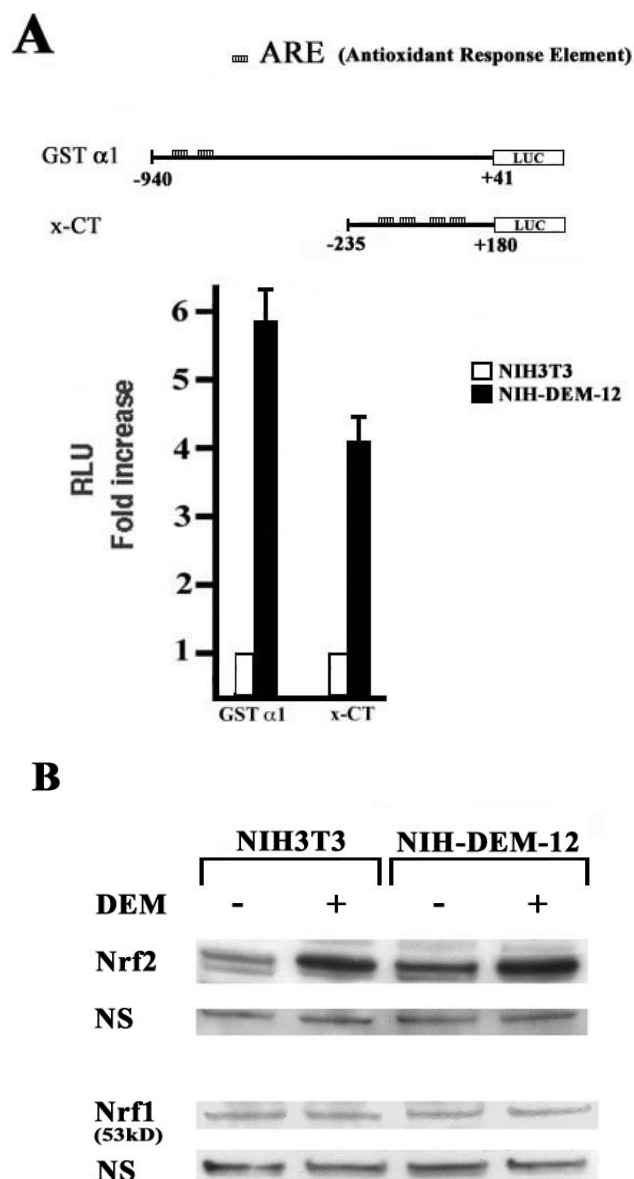


Figura 5 Regolazione trascrizionale nel clone NIH-DEM-12

Pannello A. Le regioni promotrici dei geni GST $\alpha 1$ (-940/+41) e x-CT (-235/+180) sono state amplificate per PCR utilizzando come stampo il DNA genomico delle cellule NIH3T3 e sono state clonate a monte del gene della luciferasi. Sono indicate le localizzazioni della sequenze ARE. Tali costrutti luciferasi sono stati trasfettati transientemente in triplicato nella cellule NIH3T3 e nelle cellule NIH-DEM-12, insieme con il vettore pRLSV40, che codifica per luciferasi di Renilla. Dopo 36 ore dalla trasfezione, le cellule sono state raccolte ed è stata misurata l'attività luciferasica come descritto nei materiali e metodi. Tale attività è stata normalizzata per Renilla e i risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

Pannello B. Analisi mediante Western Blot dei livelli nucleari delle proteine Nrf2 e Nrf1 in cellule NIH3T3 e NIH-DEM-12 in condizioni basali e dopo stress ossidativo indotto da 100 μ M di DEM.

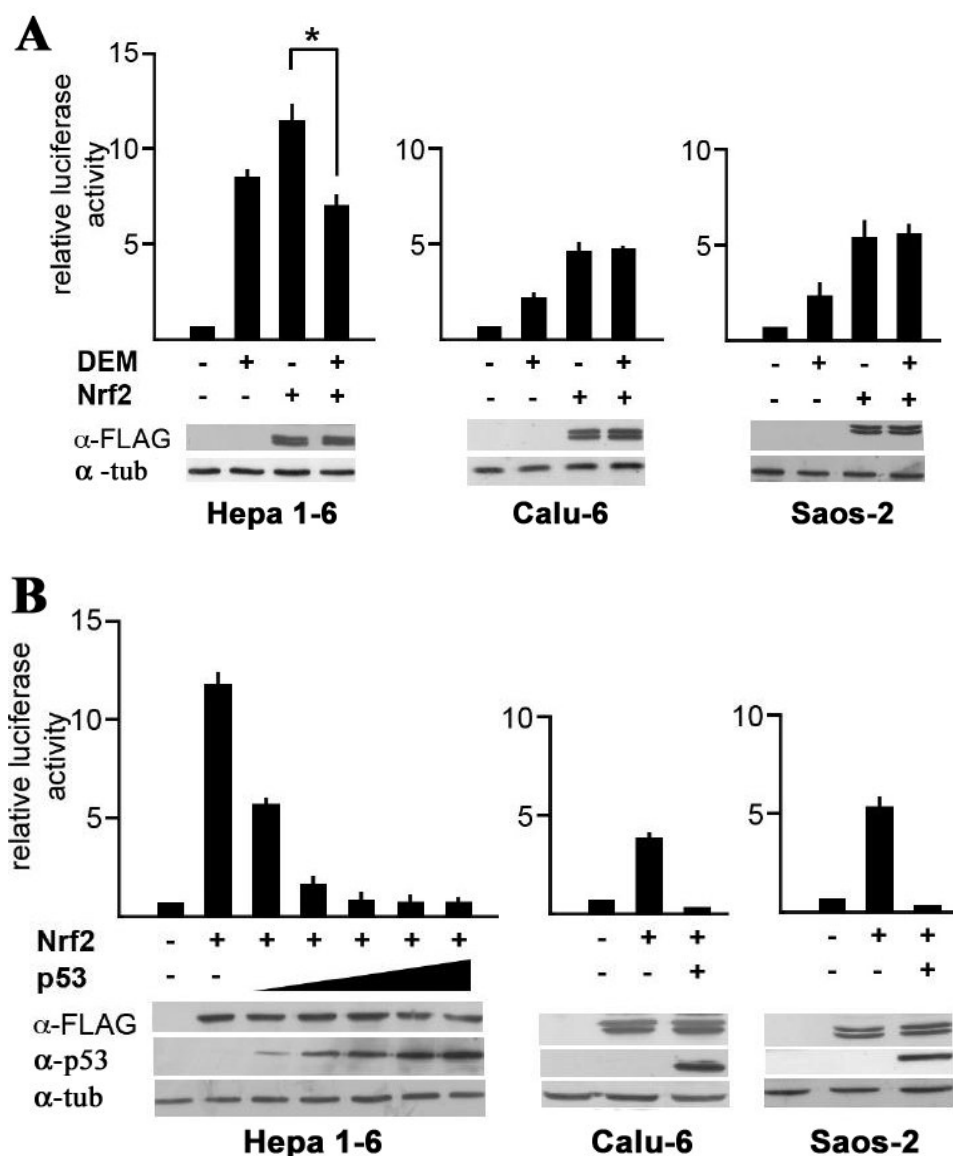


Figura 6. p53 è responsabile della repressione del promotore x-CT/Luc in seguito ad induzione con Nrf2

Pannello A. Le cellule Hepa 1-6, Calu-6 e Saos-2 sono state trasfettate con il costrutto -235/+45 x-CT/Luciferasi (x-CT/Luc). Esse sono state anche co-trasfettate con il vettore di espressione FLAG-Nrf2 o con uguali quantità di vettore vuoto. Dopo 30 ore dalla trasfezione le cellule sono state trattate con 100 μ M di DEM in DMSO, o con DMSO, per 4 ore. L'attività luciferasica è stata analizzata come descritto nei materiali e metodi. Nei pannelli inferiori sono riportati Western Blot di controllo per l'analisi dei livelli di FLAG-Nrf2.

Pannello B. Le cellule Hepa 1-6, sono state co-trasfettate con x-CT/Luc, FLAG-Nrf2 e con quantità crescenti di un vettore di espressione per p53 (le quantità di p53 sono: 0,125 μ g, 0,25 μ g, 0,5 μ g, 1 μ g e 2 μ g). Nelle cellule Calu-6 e Saos-2 la quantità di p53 corrisponde a 0,125 μ g.

Nei pannelli inferiori (sia di A che di B) sono riportati esperimenti di Western Blot per controllare i livelli di espressione di FLAG-Nrf2 e di p53.

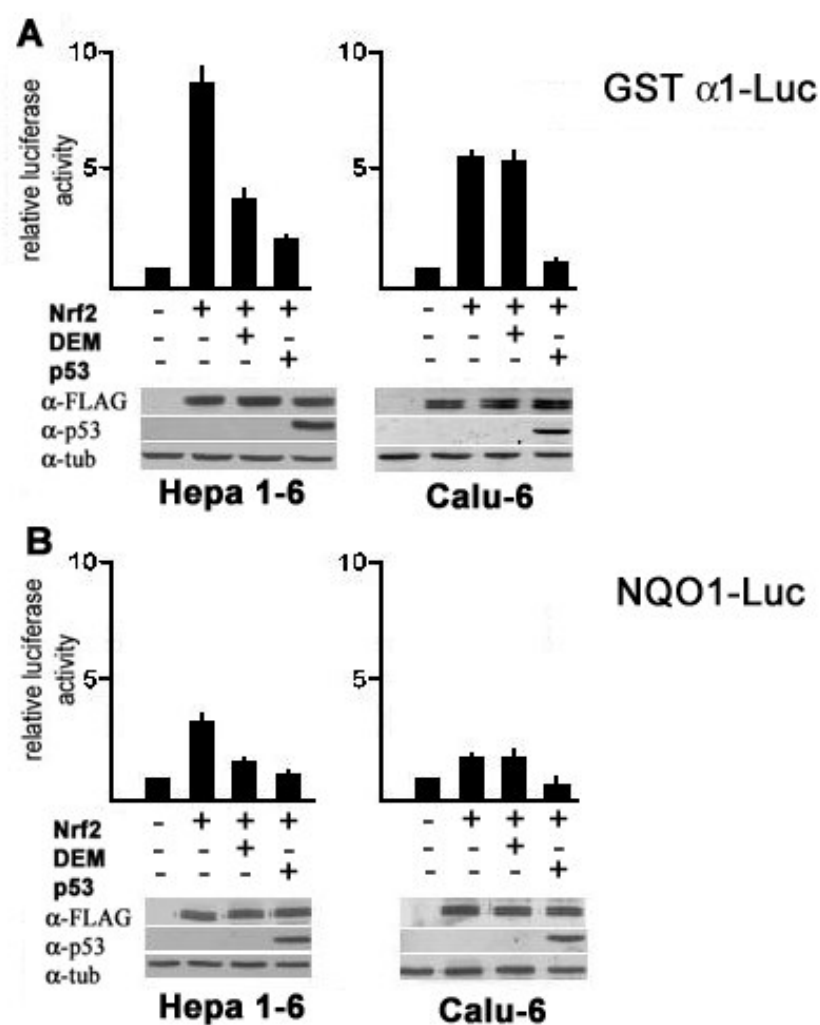


Figura 7. p53 sopprime l'attivazione Nrf2-dipendente dei promotori GST α 1 e NQO1

Le cellule Hepa 1-6 e Calu-6 sono state co-trasfettate con 2 μ g dei costrutti GST α 1/Luc (Pannello A) e NQO1/Luc (-923/+111 del promotore di NQO1 a monte del gene luciferasi) (Pannello B), con 0,15 μ g di FLAG-Nrf2. Dopo 30 ore dalla trasfezione le cellule sono state trattate per 3 ore con 100 μ M di DEM e raccolte per il saggio luciferasi effettuato come descritto nei materiali e metodi.

Nei pannelli inferiori (sia di A che di B) sono mostrati i Western Blot di controllo della trasfezione per misurare i livelli di espressione delle proteine FLAG-Nrf2, p53.

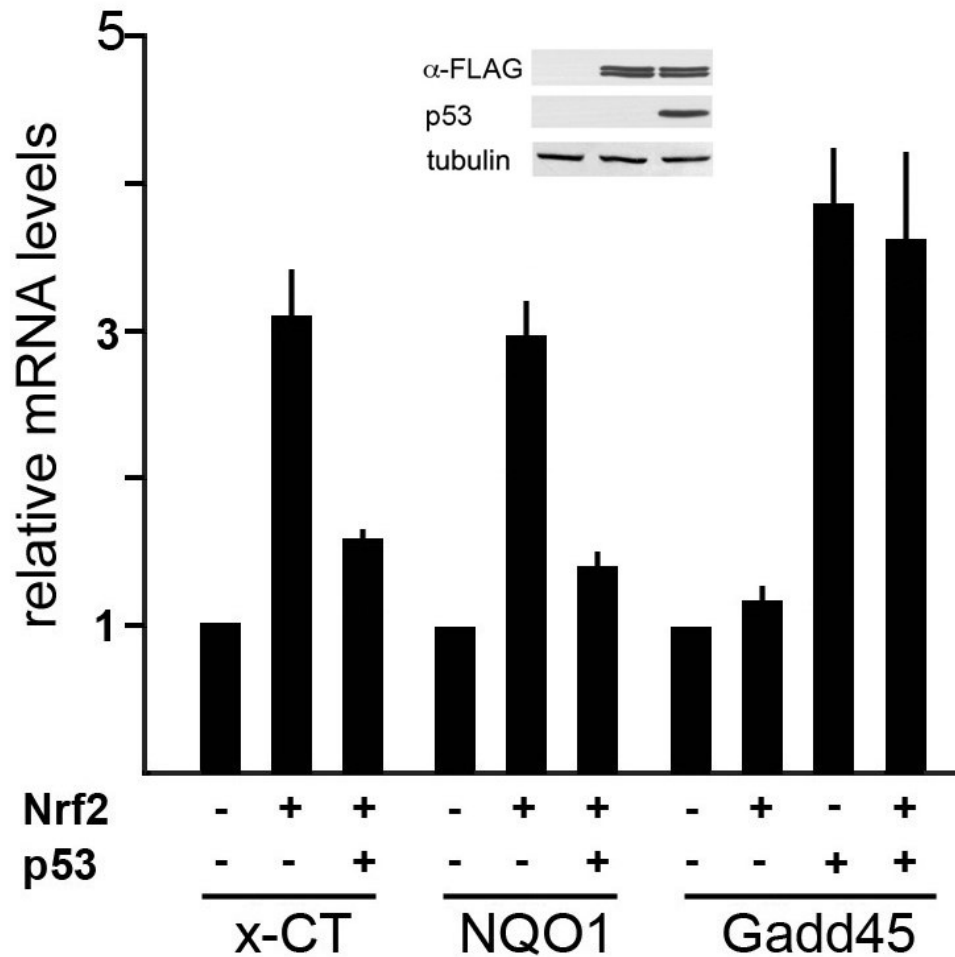


Figura 8. **p53 sopprime l'induzione Nrf2-dipendente degli mRNA dei geni endogeni x-CT e NQO1.**

Le cellule HEK 293 sono state trasfettate con in vettore di espressione FLAG-Nrf2 in presenza e in assenza del vettore di espressione per p53. Dopo 36 ore dalla trasfezione le cellule sono state raccolte e i livelli relativi di mRNA sono stati misurati mediante PCR Real Time, come descritto nei materiali e metodi. Nel riquadro in alto è riportato un Western Blot di controllo dei livelli di espressione di FLAG-Nrf2 e p53

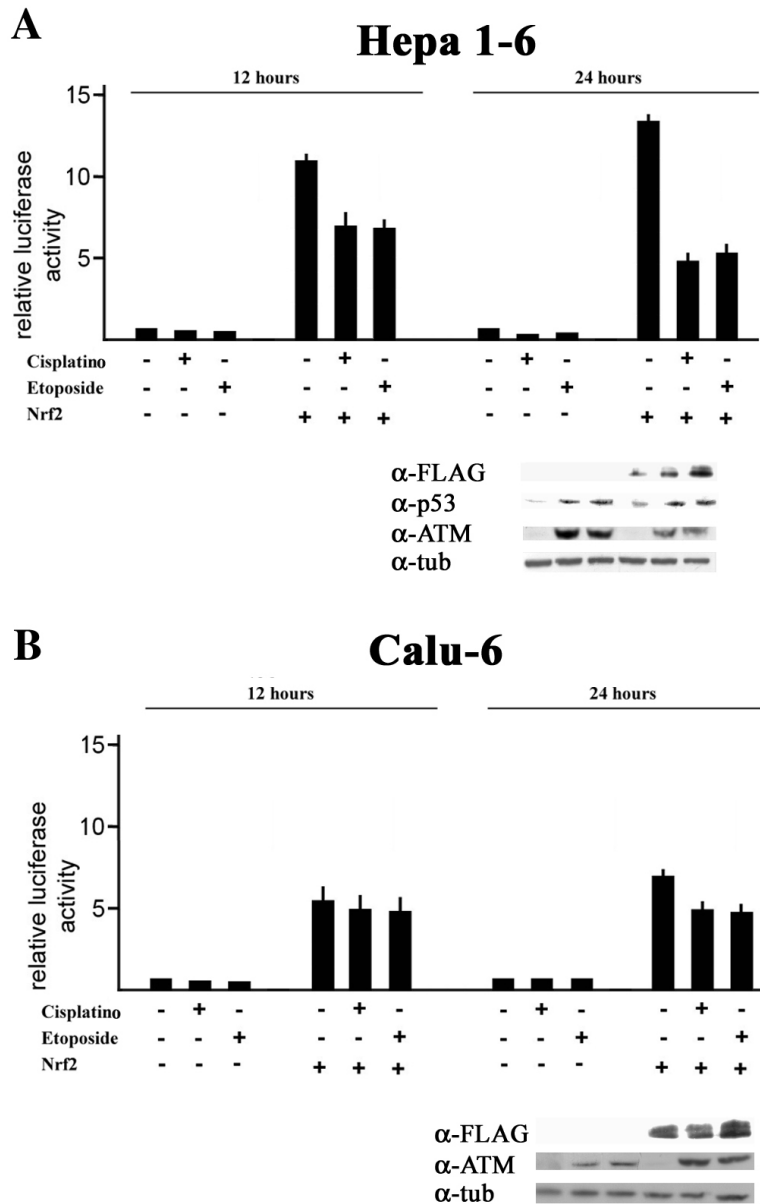


Figura 9 p53 endogeno attivato da un danno al DNA reprime l'attivazione Nrf2-dipendente del costrutto x-CT/Luc

Le cellule Hepa 1-6 (Pannello A) e le cellule Calu-6 (Pannello B) sono state trasfettate con il costrutto x-CT/Luc in assenza e in presenza del vettore di espressione per FLAG-Nrf2. Dopo 24 ore dalla trasfezione le cellule sono state trattate con cisplatino (10 μ M) ed etoposide (100 μ M) per 12 e 24 ore ed è stata misurata l'attività luciferasica.

Sono riportati (sia nel Pannello A che nel Pannello B) i Wester Blot per controllare i livelli di espressione di FLAG-Nrf2 e i livelli di pATM (e di p53 nelle cellule Hepa 1-6) dopo danno al DNA.

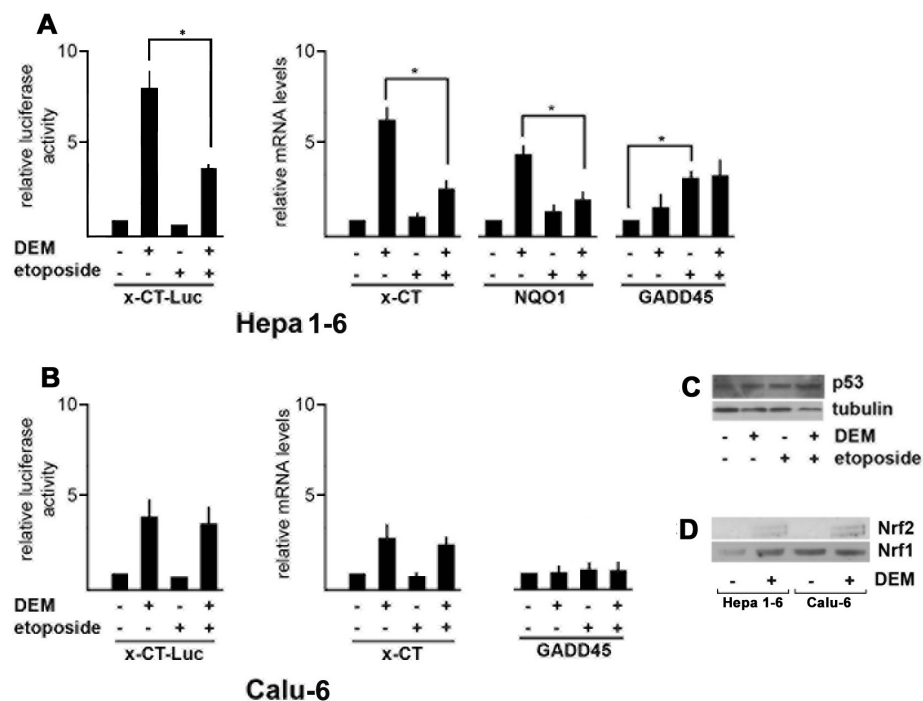


Figura 10 L'attivazione di p53 in seguito a danno al DNA reprime l'aumento della trascrizione DEM-dipendente di geni antiossidanti

Le cellule Hepa 1-6 (Pannello A) e le cellule Calu-6 (Pannello B) sono state trasfettate con x-CT/Luc. Dopo la trasfezione le cellule sono state trattate dapprima con etoposide (100 μ M per 12 ore) e poi con 100 μ M di DEM per 3 ore. A 48 ore dalla trasfezione le cellule sono state raccolte per saggiare l'attività luciferasica, e per misurare i livelli relativi di mRNA di x-CT, NQO1 e GADD45

Pannello C. Analisi nelle cellule Hepa 1-6, mediante Western Blot, dei livelli della proteina p53 dopo trattamento con etoposide e/o con DEM

Pannello D. Analisi nelle cellule Hepa 1-6 e Calu-6, mediante Western Blot, dei livelli nucleari delle proteine Nrf1 e Nrf2 dopo trattamento con 100 μ M di DEM

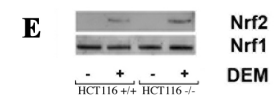
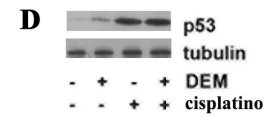
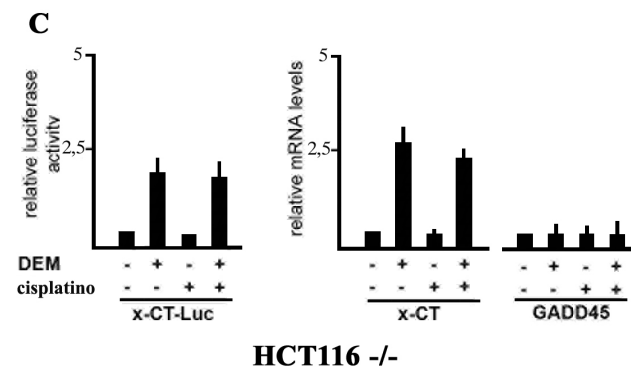
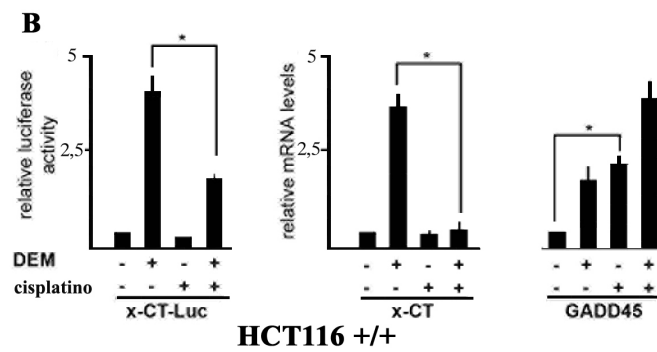
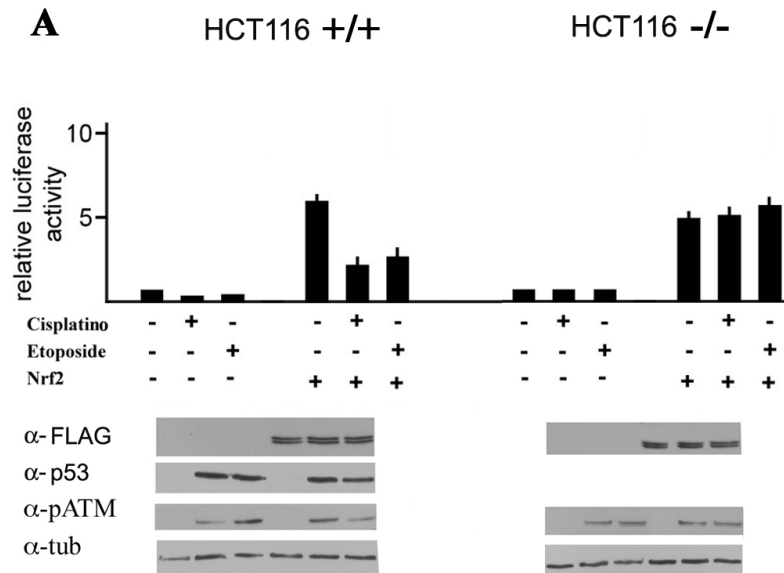


Figura 11

Pannello A. Le cellule HCT116 +/+ e le cellule HCT116 -/-, sono state trasfettate con il costrutto x-CT/Luc in assenza e in presenza del vettore di espressione per FLAG-Nrf2. Dopo 24 ore dalla trasfezione le cellule sono state trattate con cisplatino (20 μ M) ed etoposide (200 μ M) per 24 ore ed è stata misurata l'attività luciferasica. In basso sono riportati Western Blot di controllo dei livelli di espressione di FLAG-Nrf2 e i livelli di pATM (e di p53 nelle cellule HCT116 +/+) dopo danno al DNA.

Pannello B e C. Le cellule HCT116 +/+ e HCT116 -/- sono state trasfettate con x-CT/Luc. Dopo la trasfezione le cellule sono state trattate dapprima con cisplatino (20 μ M per 12 ore) e poi con 500 μ M di DEM per 3 ore. A 48 ore dalla trasfezione le cellule sono state raccolte per saggiare l'attività luciferasica, e per misurare i livelli relativi di mRNA di x-CT e GADD45

Pannello C. Analisi nelle cellule HCT116 +/+, mediante Western Blot, dei livelli della proteina p53 dopo trattamento con etoposide e/o con DEM

Pannello D. Analisi nelle cellule HCT116 +/+ e HCT116 -/-, mediante Western Blot, dei livelli nucleari delle proteine Nrf1 e Nrf2 dopo trattamento con 500 μ M di DEM